

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Institut Ruđer Bošković u Zagrebu
Sveučilište u Dubrovniku
Poslijediplomski interdisciplinarni sveučilišni studij
Molekularne bioznanosti

MARIJA ČULJAK

ULOGA CITOKINA U ALZHEIMEROVOJ BOLESTI

DOKTORSKA DISERTACIJA

Osijek, 2020

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Institut Ruđer Bošković u Zagrebu
Sveučilište u Dubrovniku
Poslijediplomski interdisciplinarni sveučilišni studij
Molekularne bioznanosti

Marija Čuljak

ULOGA CITOKINA U ALZHEIMEROVOJ BOLESTI

DOKTORSKA DISERTACIJA

Doktorska disertacija predložena
Sveučilišnom Vijeću za poslijediplomske interdisciplinarne doktorske studije radi stjecanja
akadenskog stupnja
doktora molekularnih bioznanosti - modul biomedicina

Osijek, 2020

Doktorska disertacija izrađena je u Laboratoriju za molekularnu neuropsihijatriju Zavoda za molekularnu medicinu Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu, pod vodstvom prof. dr. sc. Nele Pivac, znanstvene savjetnice, u sklopu Poslijediplomskog interdisciplinarnog sveučilišnog studija Molekularne bioznanosti u Osijeku. Probir, dijagnostički postupci i evaluacija ispitanika s Alzheimerovom bolešću i ispitanika s blagim kognitivnim poremećajem učinjena je u Klinici za psihijatriju Vrapče pod vodstvom psihijatra doc. dr. sc. Suzana Uzun, znanstvene savjetnice.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Sveučilište u Dubrovniku
Institut Ruđer Bošković

Doktorska disertacija

Poslijediplomski interdisciplinarni sveučilišni studij Molekularne bioznanosti

Znanstveno područje: Interdisciplinirano područje znanosti

Znanstvena polja: Biologija i Temeljne medicinske znanosti

ULOGA CITOKINA U ALZHEIMEROVOJ BOLESTI

Marija Čuljak

Disertacija je izrađena: u Laboratoriju za molekularnu neuropsihijatriju Zavoda za molekularnu medicinu Instituta Ruđer Bošković, Bijenička cesta 54, 10000 Zagreb

Mentori: prof. dr. sc. Nela Pivac, znanstvena savjetnica u trajnom zvanju i doc. prim. dr. sc. Suzana Uzun, znanstvena savjetnica

Kratki sažetak doktorske disertacije: Sporadični oblik Alzheimerove bolesti (AB) je najčešći uzrok demencije. Blagi kognitivni poremećaj ili MCI je spoznajni poremećaj koji može prethoditi AB. Neurobiološka podloga AB uključuje neuroupalu i promijenjeno oslobađanje citokina. Ispitanici s AB imali su značajno povišenu koncentraciju TNF- α i značajno sniženu koncentraciju IL-10 i IL-1 α u serumu prema ispitanicima s MCI. Koncentracije citokina nisu bile povezane s kognitivnim propadanjem. Nije utvrđena povezanost između IL-10 rs1800896, IL-1 α rs1800587 i TNF- α rs1800629 polimorfizama i AB ili kognitivnih simptoma u ispitanika s AB i MCI. Koncentracije IL-1 α , TNF- α i IL-10 nisu se razlikovale između nosioca IL-10 rs1800896, IL-1 α rs1800587 i TNF- α rs1800629 genotipova. Slična raspodjela IL-1 α rs1800587, TNF- α rs1800629 i IL-10 rs1800896 genotipova kod osoba s AB i MCI nije potvrdila da su specifični genotipovi rizik za razvoj AB. Promjene koncentracije citokina IL-1 α , TNF- α i IL-10 su djelimično potvrdile povezanost neuroupalnog odgovora s AB.

Broj stranica: 196

Broj slika: 47

Broj tablica: 29

Broj literaturnih navoda: 392

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: Alzheimerova bolest, demencija, upala, citokini, polimorfizmi, biomarker

Datum obrane: 19. studenoga 2020

Stručno povjerenstvo za obranu:

1. Prof. dr. sc. Neven Žarković, znanstveni savjetnik u trajnom zvanju (predsjednik povjerenstva)
2. Prof. dr. sc. Đurđica Ugarković, znanstvena savjetnica u trajnom zvanju (član)
3. Prof. prim. dr. sc. Ninoslav Mimica, dr.med. specijalist psihijatar, znanstveni savjetnik u trajnom zvanju (član)
4. Prof. dr. sc. Goran Šimić, dr.med. (zamjena člana)

Rad je pohranjen u: Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici Zagreb, Ul. Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb; Gradskoj i sveučilišnoj knjižnici Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Sveučilištu Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Trg sv. Trojstva 3, Osijek.

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek **PhD thesis**
University of Dubrovnik
Ruder Bošković Institute
University Postgraduate Interdisciplinary Doctoral Study of Molecular biosciences

Scientific Area: Interdisciplinary Area of Science
Scientific Fields: Biology and Basic Medical Sciences

THE ROLE OF CYTOKINES IN ALZHEIMER'S DISEASE

Marija Čuljak

Thesis performed at: Laboratory for Molecular Neuropsychiatry, Division of Molecular Medicine, Ruđer Bošković Institute, Bijenička 54, 10000 Zagreb

Supervisors: Professor Nela Pivac, PhD, senior scientist, re-elected, Assistant Professor Suzana Uzun, PhD, MD, Primarius, senior scientist, re-elected

Short abstract: Sporadic type of Alzheimer's disease (AD) is the most frequent cause of dementia. Mild cognitive impairment or MCI is a cognitive impairment that can precede AD. Neurobiological underpinning of AD included neuroinflammation and altered cytokine release. Patients with AD had significantly increased serum TNF- α and significantly decreased IL-10 and IL-1 α concentrations compared to subjects with MCI. Concentrations of cytokines were not related to cognitive decline. No association between IL-10 rs1800896, IL-1 α rs1800587 and TNF- α rs1800629 polymorphisms and AD or cognitive symptoms in subjects with AD or MCI was detected. Concentrations of IL-1 α , TNF- α and IL-10 did not differ between carriers of the IL-10 rs1800896, IL-1 α rs1800587 and TNF- α rs1800629 genotypes. Similar distribution of the IL-1 α rs1800587, TNF- α rs1800629 and IL-10 rs1800896 genotypes in subjects with AD and MCI failed to confirm that these specific genotypes are risk for AD development. Altered concentrations of IL-1 α , IL-10 and TNF- α partially confirmed the association of neuroinflammatory response with AD.

Number of pages: 196

Number of figures: 47

Number of tables: 29

Number of references: 392

Original in: Croatian

Key words: Alzheimer's disease, dementia, cytokines, polymorphisms, biomarker

Date of the thesis defense: 19 November 2020

Reviewers:

1. Prof. Neven Žarković, PhD, senior scientist, re-elected (president of review committee)
2. Prof. Đurđica Ugarković, PhD, senior scientist, re-elected (reviewer)
3. Prof. Ninoslav Mimica, PhD, MD, Primarius, senior scientist, re-elected (reviewer)
4. Prof. Goran Šimić, PhD, MD, (substitute reviewer)

Thesis deposited in: National and University Library in Zagreb, Ul. Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb; City and University Library of Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Trg sv. Trojstva 3, Osijek.

*Svima koji ne vjeruju u sebe...
granice ne postoje, postoji rad i vjera koja pokreće.*

Zahvale

Zahvaljujem svima koji su na bilo koji način pomogli u izradi ove doktorske disertacije.

Neizmjerne i veliko hvala mentorici, prof. dr. sc. Neli Pivac, znanstvenoj savjetnici, na stručnom vodstvu, korisnim savjetima te nesebičnoj pomoći, strpljivosti i razumijevanju pri izradi ovog dokorskog rada. Svaki njen kritički osvrt tjerao me je da idem dalje, da učim, upijam neizmerno znanje, iskustvo, iskričavost, domišljatost.

Hvala mentorici doc. dr. sc. Suzani Uzun, znanstvenoj savjetnici, na pomoći u eksperimentalnom dijelu doktorske disertacije.

Zahvaljujem dr. sc. Matei Nikolac Perković na nesebičnoj pomoći u izolaciji DNA te genotipiziranju uzoraka.

Veliko hvala dr. sc. Valentini Vidranski na nesebičnoj pomoći i spremnosti da uvijek pomogne.

Hvala Ivanu na pomoći i ugodnoj suradnji.

Hvala mojoj obitelji na podršci.

Martina, Nina, Anđelko, Nikola – nije bilo lako sa mnom na ovom putovanju...

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1. Starenje populacije	2
1.2. Definicija demencije.....	3
1.2.1. Spolno ovisne razlike u riziku za razvoj demencije.....	6
1.3. Patofiziologija AB	9
1.3.1. Hipoteza amiloidne kaskade	9
1.3.2. Tau hipoteza.....	10
1.3.3. Uloga mikroglia	12
1.4. Genetika AB.....	13
1.5. Ostali čimbenici rizika za AB.....	15
1.6. Rani simptomi bolesti	16
1.6.1. Kognitivni znaci AB	17
1.6.2. Skale za ocjenu kognitivne funkcije	19
1.7. Blagi kognitivni poremećaj ili MCI.....	25
1.8. Upala	26
1.8.1. Upala i AB	27
1.9. Citokini.....	28
1.9.1. Proupalni citokini.....	34
1.9.2. Protuupalni citokini.....	36
1.9.3. Koncentracija citokina u perifernoj krvi kod bolesnika s MCI i AB.....	37
1.9.4. Genetički polimorfizmi citokina	40
1.10. Utjecaj različitih varijabli na citokine u laboratorijskim istraživanjima.....	49
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	52
2.1. Svrha istraživanja	53
2.2. Hipoteze.....	53
2.3. Cilj istraživanja	53

3.	MATERIJALI I METODE	54
3.1.	Ispitanici.....	55
3.2.	Uzorci krvi	56
3.2.1.	Određivanje citokina u serumu	57
3.3.	Izolacija genomske DNA iz krvi	63
3.3.1.	Postupak izolacije DNA.....	64
3.3.2.	Određivanje koncentracije i čistoće DNA	64
3.4.	Genotipizacija obzirom na polimorfizme gena IL-1α rs1800587, TNF-α rs1800629 i IL-10 rs1800896	65
3.4.1.	Kemikalije.....	65
3.4.2.	Postupak genotipiziranja IL-1 α rs1800587, TNF- α rs1800629 i IL-10 rs1800896 65	
3.5.	Statistička obrada podataka	68
4.	REZULTATI.....	70
4.1.	Regresijska analiza demografskih čimbenika na ishod koncentracije citokina IL-1α, TNF-α i IL-10 kod ispitanika s Alzheimerovom bolesti.....	71
4.1.1.	Regresijska analiza demografskih čimbenika na ishod koncentracije citokina IL-1 α kod ispitanika s Alzheimerovom bolesti.....	71
4.1.2.	Regresijska analiza demografskih čimbenika na ishod koncentracije citokina TNF- α kod ispitanika s Alzheimerovom bolesti.....	71
4.1.3.	Regresijska analiza demografskih čimbenika na ishod koncentracije citokina IL-10 kod ispitanika s Alzheimerovom bolesti.....	72
4.2.	Regresijska analiza demografskih čimbenika na ishod koncentracije citokina TNF-α, IL-1α, IL-10 kod ispitanika s blagim kognitivnim poremećajem	72
4.2.1.	Regresijska analiza demografskih čimbenika na ishod koncentracije citokina IL-1 α kod ispitanika s blagim kognitivnim poremećajem	72
4.2.2.	Regresijska analiza demografskih čimbenika na ishod koncentracije citokina TNF- α kod ispitanika s blagim kognitivnim poremećajem	73

4.2.3.	Regresijska analiza demografskih čimbenika na ishod koncentracije citokina IL-10 kod ispitanika s blagim kognitivnim poremećajem	73
4.3.	Demografski podaci	74
4.3.1.	Spol ispitanika.....	74
4.3.2.	Dob ispitanika	74
4.4.	Rezultati kognitivnih ljestvica kod ispitanika s Alzheimerovom bolesti i ispitanika s blagim kognitivnim poremećajem.....	76
4.4.1.	Rezultati MMSE testa kod ispitanika s Alzheimerovom bolesti i ispitanika s blagim kognitivnim poremećajem	76
4.4.2.	Rezultati Testa crtanja sata kod ispitanika s Alzheimerovom bolesti i ispitanika s blagim kognitivnim poremećajem	77
4.5.	Rezultati kognitivnih ljestvica između muških i ženskih ispitanika s Alzheimerovom bolesti i blagim kognitivnim poremećajem.....	79
4.5.1.	Rezultati Testa crtanja sata između muških i ženskih ispitanika s Alzheimerovom bolesti	79
4.5.2.	Rezultati MMSE testa između muških i ženskih ispitanika s Alzheimerovom bolesti.....	79
4.5.3.	Rezultati Testa crtanja sata između muških i ženskih ispitanika s blagim kognitivnim poremećajem	80
4.5.4.	Rezultati MMSE testa između muških i ženskih ispitanika s blagim kognitivnim poremećajem	81
4.5.5.	Rezultati bodova na Testu crtanja sata između muških i ženskih ispitanika s Alzheimerovom bolesti i muških i ženskih ispitanika s MCI.....	82
4.5.6.	Rezultati bodova na MMSE testu između muških i ženskih ispitanika s Alzheimerovom bolesti i muških i ženskih ispitanika s blagim kognitivnim poremećajem	83
4.6.	Koncentracija citokina IL-1α, TNF- α i IL-10 u serumu ispitanika s Alzheimerovom bolesti i blagim kognitivnim poremećajem.....	85
4.6.1.	Koncentracija citokina IL-1 α u serumu ispitanika s Alzheimerovom bolesti i blagim kognitivnim poremećajem	85

4.6.2.	Koncentracija citokina TNF- α u serumu ispitanika s Alzheimerovom bolesti i blagim kognitivnim poremećajem	86
4.6.3.	Koncentracija citokina IL-10 u serumu ispitanika s Alzheimerovom bolesti i blagim kognitivnim poremećajem	87
4.6.4.	Razlike u koncentraciji citokina IL-1 α u serumu između muških i ženskih ispitanika s Alzheimerovom bolesti i blagim kognitivnim poremećajem.....	88
4.6.5.	Razlike u koncentraciji citokina TNF- α u serumu između muških i ženskih ispitanika s Alzheimerovom bolesti i blagim kognitivnim poremećajem.....	89
4.6.6.	Razlike u koncentraciji citokina IL-10 u serumu između muških i ženskih ispitanika s Alzheimerovom bolesti i blagim kognitivnim poremećajem.....	90
4.7.	Razlike u frekvencijama genotipova i alela između ispitanika s Alzheimerovom bolesti i blagim kognitivnim poremećajem	92
4.7.1.	Razlike u distribuciji genotipova i alela obzirom na polimorfizam IL-1 α rs1800587.....	93
4.7.2.	Razlike u distribuciji genotipova i alela obzirom na polimorfizam TNF- α rs1800629.....	94
4.7.3.	Razlike u distribuciji genotipova i alela obzirom na polimorfizam IL-10 rs1800896.....	96
4.8.	Razlike u koncentraciji citokina IL-1α, TNF-A i IL-10 u serumu obzirom na genotip i dijagnozu	97
4.8.1.	Razlike u koncentraciji citokina IL-1 α u serumu ispitanika s Alzheimerovom bolesti i blagim kognitivnim poremećajem, obzirom na genotip IL-1 α rs1800587	97
4.8.2.	Razlike u koncentraciji citokina TNF- α u serumu ispitanika s Alzheimerovom bolesti i blagim kognitivnim poremećajem obzirom na genotip TNF- α rs1800629.....	99
4.8.3.	Razlike u koncentraciji citokina IL-10 u serumu ispitanika s Alzheimerovom bolesti i blagim kognitivnim poremećajem podijeljenih prema AA, GA ili GG genotipu obzirom na polimorfizam IL-10 rs1800896.....	100

4.9. Razlike u broju bodova postignutih na MMSE testu obzirom na genotip kod ispitanika s Alzheimerovom bolesti i ispitanika s blagim kognitivnim poremećajem.....	102
4.9.1. Razlike u broju bodova postignutih na MMSE testu obzirom na IL-1 α rs1800587 kod ispitanika s Alzheimerovom bolesti i ispitanika s blagim kognitivnim poremećajem	102
4.9.2. Razlike u broju bodova postignutih na MMSE testu obzirom na TNF- α rs1800629 kod ispitanika s Alzheimerovom bolesti i ispitanika s blagim kognitivnim poremećajem	104
4.9.3. Razlike u broju bodova postignutih na MMSE testu obzirom na IL-10 rs1800896 kod ispitanika s Alzheimerovom bolesti i ispitanika s blagim kognitivnim poremećajem	105
4.10. Razlike u broju bodova postignutih na Testu crtanja sata obzirom na genotip kod ispitanika s Alzheimerovom bolesti i ispitanika s blagim kognitivnim poremećajem.....	107
4.10.1. Razlike u broju bodova postignutih na Testu crtanja sata obzirom na IL-1 α rs1800587 kod ispitanika s Alzheimerovom bolesti i ispitanika s blagim kognitivnim poremećajem	107
4.10.2. Razlike u broju bodova postignutih na Testu crtanja sata obzirom na TNF- α rs1800629 kod ispitanika s Alzheimerovom bolesti i ispitanika s blagim kognitivnim poremećajem	109
4.10.3. Razlike u broju bodova postignutih na Testu crtanja sata obzirom na genotip IL-10 rs1800896 kod ispitanika s Alzheimerovom bolesti i ispitanika s blagim kognitivnim poremećajem	110
4.11. Korelacije demografskih i kognitivnih varijabli s koncentracijama citokina TNF-α, IL-1α i IL-10.....	112
4.11.1. Korelacije demografskih i kognitivnih varijabli s koncentracijama citokina IL-1 α , TNF- α i IL-10 za ispitanike s AB	112
4.11.2. Korelacije demografskih i kognitivnih varijabli s citokinima IL-1 α , TNF- α i IL-10 za ispitanike s MCI	113
5. RASPRAVA.....	115

5.1. Rezultati istraživanja	116
5.2. Ispitanici.....	116
5.3. Predviđanje promjena koncentracije citokina	121
5.4. Citokin IL-1α	123
5.4.1. Koncentracija IL-1 α u serumu ispitanika s Alzheimerovom bolesti i ispitanika s blagim kognitivnim poremećajem	123
5.4.2. Koncentracija IL-1 α i kognitivni simptomi	125
5.4.3. Povezanost polimorfizma gena IL-1 α rs1800587 i Alzheimerove bolesti.....	126
5.4.4. Polimorfizam gena IL-1 α rs1800587 i kognitivni simptomi	127
5.4.5. Povezanost koncentracije IL-1 α i polimorfizma gena IL-1 α rs1800587 kod ispitanika s Alzheimerovom bolesti i ispitanika s blagim kognitivnim poremećajem	129
5.5. Citokin TNF-α	130
5.5.1. Koncentracija TNF- α u serumu ispitanika s Alzheimerovom bolesti i ispitanika s blagim kognitivnim poremećajem	130
5.5.2. Koncentracija TNF- α i kognitivni simptomi.....	133
5.5.3. Povezanost polimorfizma gena TNF- α rs1800629 i Alzheimerove bolesti.....	135
5.5.4. TNF- α rs1800629 i kognitivni simptomi	137
5.5.5. Povezanost koncentracije TNF- α i polimorfizma gena TNF- α rs1800629 u ispitanika s Alzheimerovom bolesti i ispitanika s blagim kognitivnim poremećajem	139
5.6. Citokin IL-10	140
5.6.1. Koncentracija IL-10 u serumu ispitanika s Alzheimerovom bolesti i ispitanika s blagim kognitivnim poremećajem	140
5.6.2. Koncentracija IL-10 i kognitivni simptomi	142
5.6.3. Povezanost polimorfizma gena IL-10 rs1800896 i Alzheimerove bolesti.....	143
5.6.4. Polimorfizam IL-10 rs1800896 i kognitivni simptomi	145
5.6.5. Povezanost koncentracije IL-10 i polimorfizma IL-10 rs1800896 u ispitanika s Alzheimerovom bolesti i ispitanika s blagim kognitivnim poremećajem.....	146

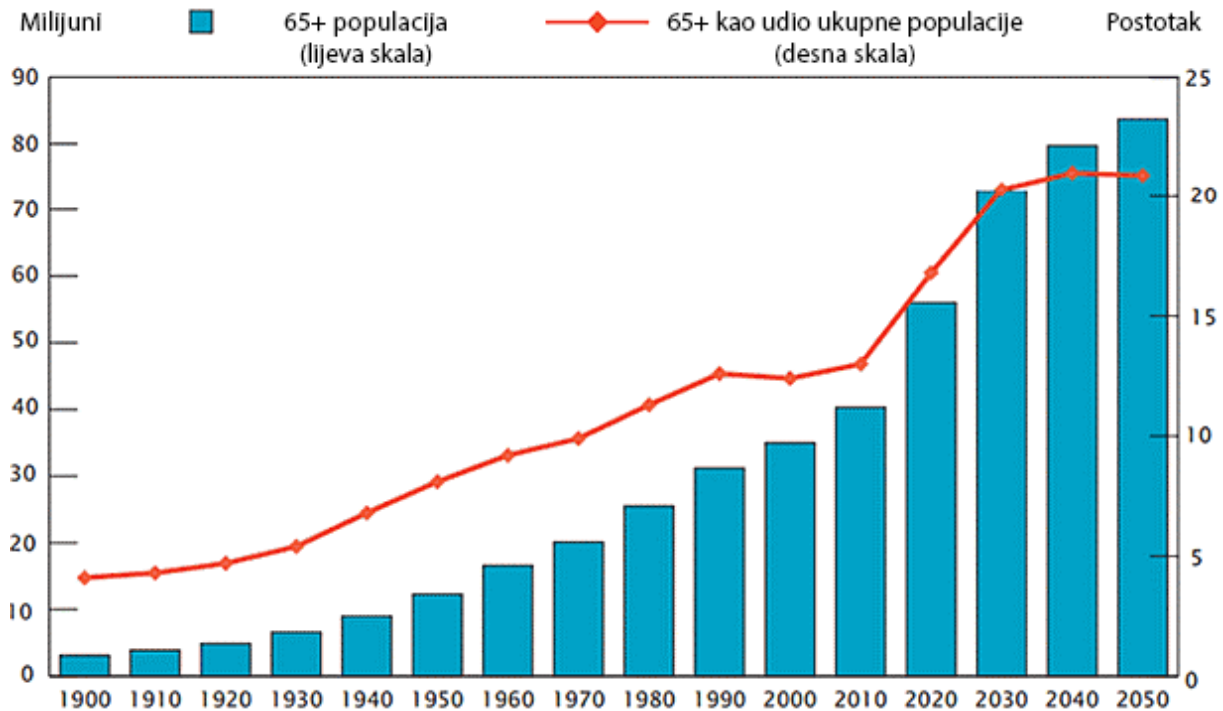
5.7. Ograničenje studije	147
5.8. Prednosti studije.....	148
5.9. Zaključak	149
6. ZAKLJUČCI.....	151
7. POPIS CITIRANE LITERATURE.....	154
8. SAŽETAK.....	184
9. SUMMARY	186
10. POPIS KRATICA	188
11. ŽIVOTOPIS	192

1. UVOD

1.1. Starenje populacije

Proces starenja stanovništva postaje važno socijalno, demografsko i zdravstveno pitanje (Slika 1.1.). Poboljšanja u cjelokupnoj kvaliteti života i medicinskom napretku utjecali su da starije osobe žive duže. Generalni fenomen starenja događa se diljem svijeta, te su ga organizacije kao što su Ujedinjeni narodi (UN) i Svjetska zdravstvena organizacija (SZO) okarakterizirali kao zabrinjavajući fenomen (Brayne i sur., 2017). Svjetska konferencija o starenju stanovništva održana je 2002. godine (Serrano i sur., 2014). Na toj konferenciji je upozoreno na različite posljedice starenja populacije. Taj je proces nazvan tihom revolucijom koja će imati ogromne posljedice na ekonomski, psihološki, socijalni i zdravstveni život ne samo pojedinca nego i cjelokupnog društva (Fernández i sur., 2013). Prema podacima Eurostata (engl. *European Statistical Office*) za Europsku uniju (EU), broj osoba starijih od 65 godina za razdoblje od 1960. - 2010. godine je gotovo dvostruk u odnosu na prijašnje razdoblje. Ta se brojka od 34 milijuna povećala na 69 milijuna. Podatci o udjelu stanovništva starijeg od 65 godina iz 2013. godine iznose 18 %, a procjene za 2060. godinu predviđaju 25 % stanovništva starijeg od 65 godina u EU (Tomaskova i sur., 2016). Prema podacima za Hrvatsku, udio starijih od 65 godina za 2011. godinu iznosio je 18 %, a procjene za 2060. god. su da će taj broj narasti na 30 % ukupne populacije. Prema projekcijama SZO broj starijih iznad 65 godina porast će na 524 milijuna ljudi. Podatci SZO procjenjuju da u svijetu 47,5 milijuna ljudi pokazuje neke simptome demencije i ta brojka nesmiljeno raste pa se procjenjuje da bi se do 2050. godine broj slučajeva mogao povećati i do 115 milijuna u svijetu. Zabrinjavajuće je što Alzheimerova bolest (AB), najčešći oblik demencije, danas zahvaća oko 60 % od 24 milijuna dijagnosticiranih slučajeva demencije u svijetu. U EU podatci govore o 6,4 milijuna osoba sa simptomima demencije (Ponjoan i sur., 2019). Porast starije populacije događa se u razvijenim zemljama. Većina populacije u starijoj dobi ima neku ili više kroničnih bolesti kao što su dijabetes, kardiovaskularne bolesti, povišeni krvni tlak, artritis, kroničnu bubrežnu bolest ili tumore. U starijoj dobi slabe i funkcije vida, sluha, a koštani sutav je krhak i lomljiv. Starenjem dolazi do značajnih promjena u središnjem živčanom sustavu (SŽS-u) i određenim regijama mozga (Peters i sur., 2006). Nakon 80. godine težina mozga se smanjuje za 10 % (Peters, 2006) i dolazi do oslabljenog i smanjenog protoka krvi u mozak. Smanjuje se brzina živčane provodljivosti, a dolazi i do gubitka neurona u kori velikog mozga i subkortikalnim regijama koje su odgovorne za pamćenje i govor (Wenk, 2003). Starenjem dolazi i do slabljenja kognitivnih funkcija kao što su pažnja, učenje, čitanje, vokabular, radna i dugoročna memorija, te brzina reakcija. Slabljenje tih funkcija, može se pokazati u vidu manjih ili većih promjena kognitivnih funkcija

(Peters, 2006). Starenjem populacije povećava se i rizik za demenciju i većina ljudi preko 85 godina ima neke znakove demencije (Bullain i Corrada, 2013). Ti znakovi zahvaćaju intelektualne i socijalne sposobnosti te otežavaju normalno svakodnevno funkcioniranje pojedinaca.



Slika 1.1. Starenje populacije i predviđanja do 2050. godine.

(Preuzeto i prilagođeno: <https://ncea.acl.gov/whatwedo/research/statistics.html>)

1.2. Definicija demencije

Demencija je pojam koji se definira kao skupina simptoma koji se odnose na promjene u kognitivnim (spoznajnim) sposobnostima, dovoljno ozbiljnim da ometaju socijalno i profesionalno funkcioniranje (Chertkow i sur., 2013). SZO demenciju definira kao sindrom u kojem dolazi do poremećaja pamćenja, razmišljanja, ponašanja i sposobnosti obavljanja svakodnevnih aktivnosti. Iako je starenje najjači čimbenik rizika i demencija se pojavljuje u starijoj populaciji, ona nije normalni dio starenja (Xian i sur., 2018). Uz poremećaj sposobnosti pamćenja, demenciju prate i drugi kognitivni poremećaji kao što su disfazija (poremećaj jezika i govora u kome je razumijevanje govora i govorno jezična razvijenost osobe snižena), apraksija (nemogućnost izvođenja smislenih, ranije naučenih motoričkih radnji, unatoč volji i fizičkoj sposobnosti da se to učini, a nastaje uslijed oštećenja neurona u SŽS-u), agnozija (nesposobnost prepoznavanja određenog objekta koristeći pri tome više osjetila, nastaje radi oštećenja desnog,

nedominantnog parijetalnog režnja), te problemi u orijentaciji i svakodnevnici. Pojam demencija dolazi od latinskog *de* što znači bez i *mens* što znači bezumnost, ludilo. Prvi koji spominje pojam demencija je Celsus oko 10. godine n. e., makar se prema opisanoj kliničkoj slici ipak radilo o nekoj vrsti manije, a ne demenciji (Howick., 2016). Godine 1838., francuski psihijatar Jean-Étienne Dominique Esquirol, prvi je istaknuo demenciju, definiranu kao stečeni proces kojeg karakterizira gubitak pamćenja, sposobnost prosuđivanja i pažnje (Nani i sur., 2013). Simptomi demencije se razlikuju od osobe do osobe. Prema Američkom udruženju za demenciju i Alzheimerovu bolest, najmanje dvije funkcije moraju biti značajno poremećene da bi se promjene smatrale demencijom, a to su pamćenje, komunikacija i govor, sposobnost koncentracije i usredotočenja na nešto, razmišljanja i prosuđivanja vizualnog doživljaja (Howe., 2013). Demencija predstavlja poremećaj mentalnih sposobnosti osobe, kao što su sposobnost razmišljanja, sposobnost pamćenja, sposobnost logičkog prosuđivanja, kao i promjene osobnosti. Najčešći uzrok demencije u današnje vrijeme je AB. Njemački psihijatar i neuropatolog dr. Alois Alzheimer još je prije više od 100 godina opisao pojavu AB kod 51-godišnje pacijentice Auguste Deter. Dr. Alzheimer je uočio povezanost simptoma bolesti i promjena na patohistološkim preparatima tkiva mozga oboljelih (Hippius i sur., 2003). Taj sindrom je po njemu i dobio ime AB (lat. *Morbus Alzheimer*) i ta bolest i danas predstavlja veliku nepoznanicu i problem.

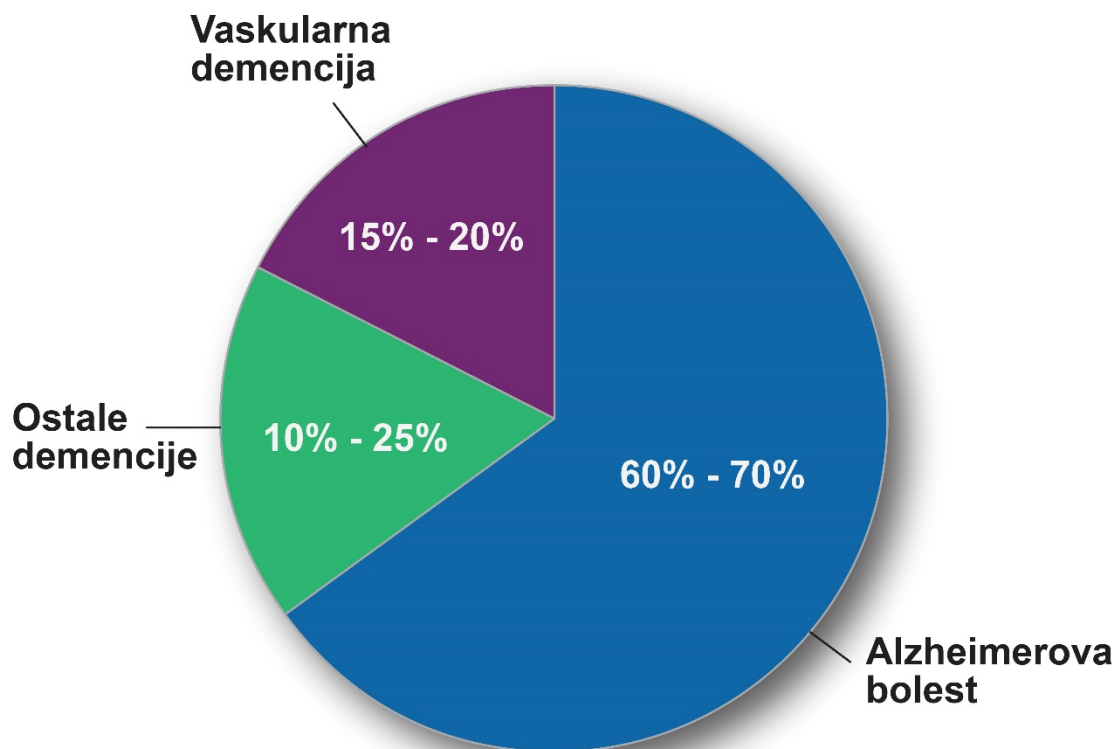
Tablica 1.1. Broj hospitalizacija zbog Alzheimerove bolesti u stacionarnim ustanovama od 2012. – 2016. godine po dobnim skupinama u Republici Hrvatskoj.

	Ukupno	0 – 64	65 – 74	75 – 84	85 – 130
2012.	225	29	68	104	24
2013.	260	39	67	129	25
2014.	302	48	84	127	43
2015.	489	82	142	208	57
2016.	612	93	205	227	87

(Preuzeto i prilagođeno: HZJZ, BSO obrazac 2012. – 2016. redovita prijava i dnevna bolnica <https://www.hzjz.hr/aktualnosti/alzheimerova-bolest/>)

Najzahvaćenija populacija su osobe iznad 65 godina, što pokazuju i podaci u RH (Tablica 1.1.) Oko 2 % populacije 65-godišnjaka zahvaćeno je s AB. Kod 70-godišnjaka pojavnost je oko 3 %, dok u populaciji 80 godina i više, 20 % osoba pokazuje znakove bolesti. SZO je 2012. godine proglasila AB vodećim svjetskim javnozdravstvenim problemom. Taj problem postaje

i zdravstveni, socijalni, medicinski i ekonomski. Sukladno tome sve članice su bile dužne izraditi nacionalni plan za borbu protiv AB. AB je najčešći oblik demencije (Slika 1.2.), a s povećanjem broja godina u starenju, povećana je i učestalost bolesti. To je progresivna, degenerativna bolest stanica moždane kore i okolnih struktura mozga, ponajprije hipokampalne regije gdje dolazi do propadanja neurona. Bolesnici s AB razvijaju promjene u pamćenju, mišljenju, snalaženju u prostoru, ponašanju i funkcioniranju uz svakodnevno i progresivno pogoršavanje. Takve osobe nemaju mogućnost samostalnog funkcioniranja i s vremenom postaju potpuno ovisne o pomoći drugih (Smebye i sur., 2012).



Slika 1.2. Pojavnost Alzheimerove bolesti i drugih demencija (Preuzeto i prilagođeno: Garre-Olmo, 2018)

Postoje dva oblika AB:

- AB s ranim početkom ili obiteljska AB (EOAD, engl. *early onset Alzheimer's disease*) povezana s Mendelovim nasljeđivanjem koja pogađa osobe mlađe od 65 godina i predstavlja oko 5 % (Mendez, 2017) svih AB slučajeva
- AB kasnog početka (LOAD, engl. *late onset Alzheimer's disease*), također poznata i kao sporadični oblik AB, bez dosljednog načina prijenosa koji pogađa osobe starije od 65

godina i predstavlja najveći broj (90 – 95 % slučajeva AB) slučajeva među starijim osobama (Barber i sur., 2012).

Klinički se AB može podijeliti u 3 skupine na temelju dobi:

- mlađa skupina s pojavom simptoma otprilike u dobi od 40 – 60 godina
- srednja skupina s pojavom bolesti u dobi od 60 – 85 godina
- kasna starosna skupina s kliničkim početkom nakon 85. godine (Ganguli i Rodriguez, 2011).

U skupini koja počinje s mlađom dobi primarni čimbenici rizika predstavljaju pozitivna obiteljska anamneza i autosomno dominantni geni (Kamboh, 2004). Rani oblik AB je uglavnom uzrokovan rijetkim, potpuno penetrantnim mutacijama u tri različita gena:

- amiloidni prekursorski protein (APP)
- presenilin 1 (PSEN1)
- presenilin 2 (PSEN2), (Lanoiselée i sur., 2017)

Za pojavu AB čimbenici rizika su genotip APOE4 (Corder i sur., 1993), kardiovaskularna i cerebrovaskularna bolest, povišeni krvni tlak, šećerna bolest, visoki kolesterol i povećan indeks tjelesne mase (Craft, 2009). Genetski polimorfizmi apolipoproteina E (APOE), a posebno APOE4 varijanta alela, glavni su čimbenici rizika za sporadični oblik AB, koji u kombinaciji s čimbenicima iz okoline mogu snažno utjecati na razvoj AB (Tanzi i sur., 2012).

U ovom istraživanju smo uključili samo ispitanike s kasnim oblikom AB, te su u daljnjem tekstu svi ispitanici s kasnim oblikom AB ili sporadičnim oblikom AB nazivani bolesnicima/ispitanicima s AB.

1.2.1. Spolno ovisne razlike u riziku za razvoj demencije

Smatra se da spol utječe na razvoj demencije. Naime, otprilike dvije trećine osoba kojima je dijagnosticirana AB su žene (Mielke, 2018). Također, životni vijek žena je duži nego muškaraca, a dob je najveći rizik za AB. Radi toga je rizik za obolijevanje od AB veći za žene (Rocca, 2017). No ti podatci nisu jednoznačni, pa u Sjedinjenim Američkim Državama prevladavaju rezultati studija koji pokazuju kako se učestalost AB ne razlikuje po spolu čak i nakon 85 godina života (Edland i sur., 2002), dok studije u Europskim zemljama upućuju da žene imaju veću učestalost AB nakon 80. godine života (Fratiglioni i sur., 1997). Nadalje, studija kognitivne funkcije i starenja u Ujedinjenom Kraljevstvu provedena kroz dva desetljeća izvješćuje o padu incidencije demencija od 20 % tijekom dva desetljeća, koja uključuje

smanjenje incidencije demencija među muškarcima svih dobnih skupina iznad 65 godina (Matthews i sur., 2016). Ova odstupanja u studijama upućuju da spolne razlike u učestalosti AB mogu ovisiti o vremenskom razdoblju i o zemljopisnoj regiji (Mielke sur., 2014). Daljnja istraživanja u različitim zemljama potrebna su da bi se prepoznali promjenjivi čimbenici rizika za AB.

Postoje različiti čimbenici rizika koji mogu imati jednaku ili različitu učestalost ili jednak ili različit rizik na osobe različitog spola. APOE genotip ili druge genetske varijante mogu imati jednaku učestalost za žene i muškarce, ali isto tako imati jači učinak u jednom ili drugom spolu. Navode se čimbenici rizika kao što su pušenje i obrazovanje, koji imaju isti učinak kod muškaraca i žena, ali različitu učestalost, npr. kroz povijest su žene imale manju mogućnost za obrazovanje, dok je učestalost pušenja veća kod muškaraca. Navodi se da slabije obrazovanje može imati štetniji učinak na razvoj AB kod žena (Russ i sur., 2013). Poboljšanje obrazovanja žena tijekom prošlog stoljeća, može biti razlog zašto je incidencija opadanja demencija u nekim zemljama viša za žene nego za muškarce (Langa i sur., 2017). Traume glave češće su kod muškaraca u usporedbi sa ženama, ali žene mogu biti osjetljivije na štetne učinke ozljede glave (Biswas i sur., 2017). Nadalje, postoje čimbenici rizika koji su ograničeni samo na jedan spol kao što su trudnoća, rak prostate i uklanjanje androgena (Rocca i sur., 2014). Depresija je također jedan od čimbenika rizika za razvoj AB, a poznato je da žene imaju dvostruko veći rizik za razvoj depresije nego muškarci (Kessler i sur., 1993). Studije pokazuju da je depresija čimbenik rizika za AB i za muškarce i za žene, budući da je prevalencija depresije veća kod žena nego kod muškaraca, depresija može imati veći učinak na rizik za razvoj od demencija kod žena nego u muškaraca (Ownby i sur., 2006).

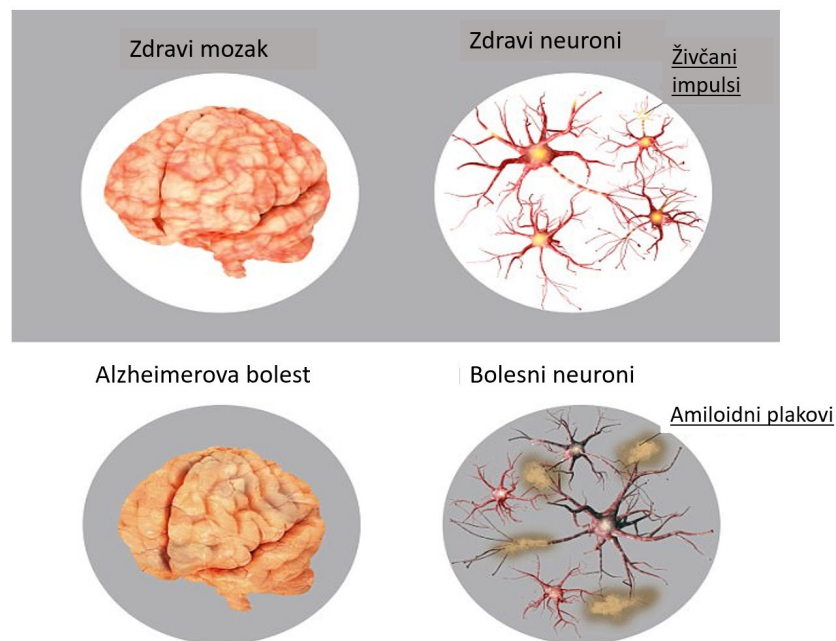
Američko udruženje za AB (AFA, engl. *Alzheimer's Foundation of America*) izdalo je službenu publikaciju o 10 ranih simptoma ili simptoma upozorenja. Simptomi su prikazani u Tablici 1.2.

Tablica 1.2. Deset ranih simptoma AB

1	Gubitak pamćenja	Jedan od prvih i najčešćih znakova, razvija se postepeno, nedavna događanja se zaboravljaju, zaboravljaju se datumi, važne informacije i događaji
2	Problemi u rješavanju svakodnevnih aktivnosti	Osoba teško izvršava svakodnevne aktivnosti kao što su kuhanje, pranje, čišćenje, osobna higijena
3	Problemi čitanja, pisanja i govornog izražavanja	Osoba zaboravlja riječi, govor je često nerazumljiv, bez smisla, često se riječi ponavljaju ili koristi fraze
4	Poteškoće u prostornoj i vremenskoj orijentaciji	Osoba se ne može sjetiti koji je dan, mjesec ili godina, ne zna koje je godišnje doba, ponekad ne znaju gdje su pošli i kako doći
5	Poteškoće u procjenjivanju i donošenju odluka	Osoba može imati probleme s vožnjom, s odijevanjem u odnosu na vremenske prilike, razlikovanje boja, rukovanje s novčanicama
6	Poteškoće u apstraktnom mišljenju	Osoba može imati probleme s praćenjem ili pridruživanjem u govoru, nekad ne znaju kako nastaviti, nazivaju stvari pogrešnim imenom
7	Poteškoće zaboravljivosti gdje su stavili neke stvari	Osoba ostavlja stvari na neobična mjesta, često traženje zametnutih stvari, optužuju druge osobe za krađu
8	Promjena raspoloženja i ponašanja	Osoba mijenja raspoloženje, smjenjuju se nemir, nervoza, ljutnja, tuga, plakanje i smjeh
9	Povlačenje od rada ili socijalnih aktivnosti	Osoba se otuđuje od društvenih aktivnosti, hobija, sporta, može se javiti strah od svega u okolini, javlja se ljubomora, nepovjerenje
10	Gubitak interesa i osobnosti	Osoba je zbunjena, prestrašena, zabrinuta, lako se uznemiri, potpuno je nezainteresirana, osjeća se napušteno i osamljeno

1.3. Patofiziologija AB

Degenerativne promjene u cerebralnom korteksu (atrofija moždane kore, smanjenje ukupne moždane mase, pojava senilnih plakova i neurofibrilarnih snopića, gubitak neurona) praćene su smanjenjem psihičkih i tjelesnih sposobnosti i obično se povezuju sa starenjem (Slika 1.3.). Smatra se da degenerativne promjene nastaju i u mlađoj životnoj dobi, ali pojava simptoma vezanih za te promjene, pokazuje se tek u starijoj životnoj dobi (Harada i sur., 2013).



Slika 1.3. Razlike u volumenu mozga i građi neurona između osoba s Alzheimerovom bolešću i zdravih ispitanika. (Preuzeto i prilagođeno: https://www.123rf.com/photo_66827292_the-patient-and-the-brain-healthy-brain-and-neurons-in-comparison-alzheimer-s-disease-amyloid-plaque.html)

1.3.1. Hipoteza amiloidne kaskade

Na patohistološkim preparatima tkiva pacijenata koji su umrli od posljedica AB nalaze se amiloidni plakovi i neurofibrilarni snopići. Senilni plakovi su izvanstanične kuglaste nakupine koji se sastoje od gustog, uglavnom netopljivog proteinskog materijala. Glavna komponenta plakova je peptid amiloid beta ili A β . Neurofibrilarni snopići su nakupine u neuronima čija je glavna komponenta hiperfosforilirani oblik proteina tau. Najvažnija tkivna promjena je agregacija amiloidnih peptida (Stefani i Rigacci, 2013). Peptidi A β su proizvodi metabolizma proteina APP (prekursor amiloidnog proteina, engl. *amyloid precursor protein*) u neuronima, a

sastoje se od 36 do 43 aminokiseline (Querfurth i sur., 2010). Vjeruje se da krivo procesiranje APP-a rezultira različitim fragmentima od kojih je najtoksičniji A β 42. Peptid A β se spontano nakuplja u oligomere koji sadrže 2 do 6 peptida, koji mogu prijeći u intermedijarne oblike. Uz to ovaj peptid može postepeno rasti i stvarati netopive fibrile koji tvore amiloidne plakove. Topivi oligomeri i prijelazni oblici smatraju se najtoksičnijima od svih formi A β (Glabe, 2008). Plakovi se razvijaju u hipokampusu koji ima važnu ulogu u procesiranju informacija iz kratkoročnog pamćenja u dugoročno pamćenje, kao i u formiranju, organiziranju i pohranjivanju sjećanja. Osim u hipokampusu, plakovi se razvijaju i u drugim dijelovima moždane kore koji su važni za procese razmišljanja i donošenja odluka. AB se prvenstveno svrstava u bolest u kojoj je primarno naglašeno propadanje sinapsi. Bolest ne uzrokuje samo prekid komunikacije između neurona nego i oštećuje neurone koji više ne mogu normalno funkcionirati i na kraju dolazi do apoptoze neurona (Sheng i sur., 2012). Signalne molekule odnosno različiti neurotransmitori, važni za pamćenje, kao što je acetilkolin, su inhibirani, te dolazi do sprječavanja otpuštanja neurotransmitora iz presinaptičkih neurona (Kandimalla i Reddy, 2017). Važni proteini u tim procesima su neurotrofni čimbenici, koji potiču proliferaciju, diferencijaciju, rast i razvoj i opstanak neurona i glija stanica te posreduju u procesima pamćenja, učenja i ponašanja (Xiao i Le, 2016). Normalne visoke razine neurotrofinskih receptora u kolinergičnim neuronima prednjeg mozga uvelike su smanjene u bolesnika koji boluju od AB (Lee i sur., 2013). A β u mitohondrijima djeluje poput otrova jer inhibira ključne mitohondrijske enzime u mozgu što posebno utječe na sinapse i citokrom C oksidazu (Eckert i sur., 2011). Kao posljedica, prijenos elektrona, proizvodnja ATP-a i mitohondrijski membranski potencijal su inhibirani što dovodi do oksidativnog stresa, otpuštanja citokroma C i apoptoze stanica. Slobodni radikali nastaju u mitohondrijima, a oštećenja mitohondrija u AB i u normalnom procesu starenja uzrokuju znatan oksidativni stres koji prethodi patološkim promjenama u AB (Tönnies i Trushina, 2008). Oksidativni stres utječe i na povećanje membranske propusnosti za ione kalcija, kao i ostale ione, inhibira prijenos glukoze, ometa neurotransmisiju te uzrokuje neravnotežu energije u stanicama. A β formira o naponu neovisne ionske kanale u lipidnim membranama, rezultirajući poremećajem unutarstanične kalcijeve homeostaze i propadanjem neurona (Querfurth i sur., 2010).

1.3.2. Tau hipoteza

Protein tau je mikrotubulima pridruženi protein (MAP, engl. *microtubule-associated protein*). Kodiran je humanim TAU genom koji se nalazi na dugom kraku 17. kromosomu (poziciji 17q21). Tau proteini se na aksonima neurona vežu za tubulin-protein, čiji dimeri stvaraju

mikrotubule i imaju važne uloge u njihovom slaganju i stabilnosti. Protein tau veže druge proteine i ima ulogu u prijenosu signala i ravnoteži ostalih čimbenika citoskeleta (Correas i sur., 1990). Tau je protein koji je povezan s mikrotubulima u neuronima. Funkcije koje se pripisuju tau proteinu su održavanje strukturnog integriteta i signalizacija unutar i između neurona (Guo i sur., 2017). U ljudskom mozgu postoji 6 različitih izoformi tau proteina koje su eksprimirane alternativnim spajanjem MAPT gena, koji sadrži 16 eksona (Guo i sur., 2000). Iz primarnog tau transkripta alternativnim izrezivanjem nastaje 5 tau izoformi u odraslom i jedna tau izoforma u fetalnom mozgu (Buée i sur., 2000). Kod odraslih osoba, najdulju izoformu predstavlja tau izoforma s najvećim brojem aminokiselina (441), te se redaju izoforme sa po 410, 412, 381 i 383 aminokiselina. Najkraća tau izoforma sadrži 352 aminokiseline i pronalazi se samo u fetalnom mozgu (Buée i sur., 2000). Ravnoteža tih izoformi je bitna, jer su promjene u ravnoteži izoformi povezane s mutacijama u aminokiselinskom slijedu (Espinoza i sur., 2008).

1.3.2.1 Fosforilacija tau proteina

Akumuliranje visoko fosforiliranog tau proteina ključna je patološka značajka nekoliko neurodegenerativnih taupatija, uključujući i AB (Noble i sur., 2013).. Mnogi fosforilirani ostaci u tau proteinu nalaze se u prolinom bogatoj domeni tau, bočnoj domeni koja veže mikrotubule. I fosforilacijski status i izoformna ekspresija tau proteina su razvojno regulirani i oba su važni čimbenici za plastičnost citoskeleta tijekom embriogeneze i ranog razvoja (Hanger i sur., 2009). U ranim fazama razvoja izražava se jedna tau izoforma, 0N3R, a tau fosforilacija povišena je u odnosu na mozak odrasle osobe. Suprotno tome, svih šest tau izoformi prisutno je u normalnom zreлом ljudskom mozgu, a u ovoj fazi tau fosforilacija je relativno smanjena (Hanger i sur., 2007). Iako postoji značajna heterogenost između različitih tau-patija, akumulirani tau u patološkim lezijama uvijek je visoko fosforiliran (Tavares i sur., 2013). Pokazano je da veliki broj različitih kinaza i fosfataza regulira tau fosforilaciju, a neravnoteža u aktivnosti tau kinaze i fosfataze rezultira tau hiperfosforilacijom u bolestima (Dolan i Johnson, 2010). Tau kinaze uključuju:

- prolinski usmjerena kinaza glikogen sintaza kinaza-3 (GSK-3), ciklin-ovisna kinaza 5 (CDK5) 5'adenozin monofosfatno aktivirana protein kinaza (AMPK) (Thornton i sur., 2011)
- kazein kinaza 1 (CK1), kinaze koje reguliraju afinitet mikrotubula (MARKs), ciklička AMP-ovisna protein kinaza A (PKA) i kinaza 1A (DYRK-1A) regulirana dvostrukom specifičnošću tirozin-fosforilacijom (Sheppard i sur., 2012)

- Tirozin kinaze, uključujući Fyn, Abl i Syk (Lebouvier i sur., 2007)

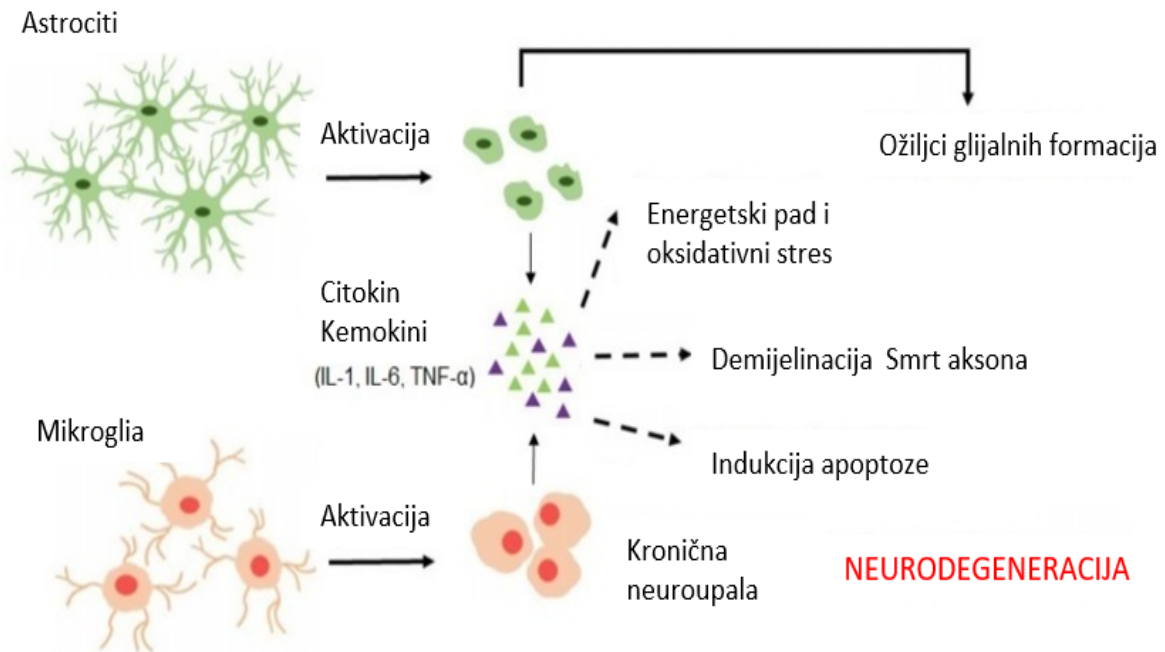
Uz te kinaze, nekoliko fosfataza defosforilira tau, uključujući proteinsku fosfatazu-1, -2A i -5 (PP1, PP2A i PP5) (Liu i sur., 2005). Uz abnormalnu fosforilaciju, tau protein u mozgu kod neurodegenerativne bolesti može se mijenjati na više načina, uključujući N- i C-proteolitičko cijepanje, promijenjenu konformaciju, nitriranje, glikozilaciju, acetilaciju, glikaciju, ubikvitaciju, O-GlcNAcilaciju, agregaciju i stvaranje filamena (Yuzwa i sur., 2011). Dosta je istraživanja usmjereno na rasvjetljavanje odnosa fosforilacije i promjena u strukturi tau proteina koje su uobičajene u mozgu neurodegenerativnih bolesti (Martin i sur., 2011). Velike nakupine hiperfosforiliranog tau-proteina mogu dovesti do oštećenja živčanih stanica i na taj način uzorkovati razvoj AB. Neke mutacije mogu biti posljedica nenormalne i povišene fosforilacije tau-proteina i njihove agregacije (Iqbal i sur., 2010). Protein tau je normalno topljivi protein u aksonima. Kada dođe do njegove hiperfosforilacije i taloženja, postaje netopljiv i gubi afinitet za mikrotubule. Veže se s drugim proteinima, tvori neurofibrilarne niti i time dovodi do poremećaja aksonskog transporta tvari i informacija u neuronima. Kod pacijenata kod kojih je dijagnosticirana AB, fosforilacija tau-proteina događa se u frontalnom korteksu. Neurofibrilarni snopići koji sadrže hiperfosforilirani oblik proteina tau predstavljaju patološki marker razvijene AB (Malnar i sur., 2009). Povišena koncentracija tau proteina nalazi se u cerebrospinalnom likvoru oboljelih od AB i ta koncentracija je povećana 3 – 4 puta u odnosu na kontrolnu skupinu iste dobi (Blennow, 2004).

1.3.3. Uloga mikroglia

Aktivacija mikroglia je vrlo rani proces u patogenezi AB. Aktivirana mikroglia može se otkriti vrlo rano u samom početku bolesti (Cagnin i sur., 2001). U mišjem modelu AB, aktivirana mikroglia je primijećena prije stvaranja amiloidnih plakova (Heneka i sur., 2005). Aktivirana mikroglia potiče signalne molekule kao što su citokini, čimbenici rasta, kemokini i molekule stanične adhezije. Osim toga mikroglia ima ulogu i u evoluiranju plaka fagocitiranjem ili degradiranjem deponiranog A β (Cui i sur., 2002). Aktivacija mikroglia i astrocita zajedno s odgovarajućim upalnim reakcijama također je važan događaj u patogenezi AB. Agregirani amiloidni fibrili i upalni medijatori koje luči mikroglia, pojačavaju disfunkciju neurona i njihovu smrt. Disfunkcija neurona smatra se neposrednim uzrokom bolesti (Hardy, 2002).

Neuropala je uključena u etiologiju AB. Epidemiološke studije pokazuju povezanost između suzbijanja upale i smanjenog rizika za AB (Breitner i sur., 2001). Zaštitni učinci nesteroidnih

protuupalnih lijekova na oboljele od AB također podupiru tezu o neuroupali (Vlad i sur., 2008). Učinci nesteroidnih protuupalnih lijekova istraženi su na životinjskim modelima i uključili su smanjenu aktivnost glija, općenito poboljšanje, smanjenu razinu A β kao i smanjenu veličinu plakova (Lin i sur., 2000).



Slika 1.4. Štetni učinci glija (Preuzeto i prilagođeno: Sajja i sur., 2016)

Obiteljska anamneza AB uvelike utječe na povećanje rizika za razvoj bolesti. Kako bi se moglo preventivno djelovati, cilj je uočiti one osobe koje imaju najveći rizik za razvoj AB. Neka istraživanja pokazuju da odrasla djeca čije su majke imale razvijenu AB imaju za 20 % veći rizik za razvoj bolesti i razvijaju kognitivne poremećaje i u ranijoj dobi u odnosu na djecu čiji su očevi razvili AB (Mosconi i sur., 2010). Razumijevanje genetskih mehanizama je od izuzetnog značenja kako bi se moglo pristupiti preventivnim postupcima prije pojave kliničkih znakova oboljenja (Mosconi i sur., 2010).

1.4. Genetika AB

Ne zna se točan uzrok AB, ali postoji čitav niz teorija. Veliki broj istraživanja bavi se djelovanjem skupina gena na 1.,14.,19. i 21. kromosomu koji se u kombinaciji s djelovanjem

čimbenika rizika iz okoline mogu povezati s razvojem AB. Genetski čimbenici imaju ujecaj na sve forme demencija, osobito u ranoj fazi (Tanzi i sur., 2012).

Obiteljski ili nasljedni oblik AB ili FAD (engl. *Familial Alzheimer's disease*) se nasljeđuje autosomno dominantno, a rani simptomi najčešće se pokazuju prije 65. godine života. Drugi naziv za ovaj oblik AB je rani oblik AB ili EOAD i on je vrlo rijedak. Taj je oblik AB izazvan genskim mutacijama na tri gena: mutacijom gena za transmembranski amiloidni prekursori protein (APP) na kromosomu 21, mutacijom gena za presenilin 1 (PSEN1) na kromosomu 14 i mutacijom gena za presenilin 2 (PSEN2) na kromosomu 1 (Tablica 1.3.).

Gen za apolipoprotein E4 (APOE4) na kromosomu 19 predstavlja, tzv. genetski rizični čimbenik za razvoj AB, no postojanje tog alela ne znači nužno da će osoba koja ima tu mutaciju razviti AB (Cohn-Hokke i sur., 2012). Mutacije ovih gena dovode do povišene proizvodnje i taloženja β -amiloidnog proteina (A β) koji je netopljiv i njegovim taloženjem stvaraju se senilni plakovi (Schindler i sur., 2015). Trisomija 21 (Downov sindrom) dovodi do ranog razvoja AB obično nakon 40. godine života. Istraživanja mutacija gena APP, PS1 i PS2 omogućilo je otkrivanje molekularnog mehanizma AB (Thinakaran i sur., 1999).

Sporadični ili kasni oblik AB, LOAD je i najčešći oblik AB. Nastaje kao posljedica genskog djelovanja u kombinaciji s djelovanjem različitih čimbenika rizika. Nastaje kao posljedica djelovanja nekoliko gena. Najistraženiji je polimorfizam gena apolipoproteina E (APOE), a pojavljuje se u 3 različite forme, i to kao aleli APOE2, APOE3 i APOE4 (Schindler i sur., 2015). APOE gen, smješten na kromosomu 19, pokazuje genetski polimorfizam s tri uobičajena alela, APOE2, APOE3 i APOE4, koji pokazuju izrazite razlike u njihovoj distribuciji među raznim etničkim skupinama (Saunders i sur., 1993). APOE gen kodira apolipoprotein E. APOE čini sastavni dio lipoproteina plazme i odgovoran je za transport i metabolizam lipida, najčešće kolesterola, između stanica i različitih organa, povezan je s različitim podtipovima lipoproteina male gustoće:

- lipoproteine vrlo male gustoće (VLDL)
- lipoproteinima umjerene gustoće
- nekim podtipovima kolesterola visoke gustoće (HDL)

Lipoproteini su odgovorni za „pakiranje” kolesterola i drugih lipida i njihovo prenošenje kroz krvotok. APOE ima ulogu u čišćenju tih lipoproteina u plazmi jer služi kao ligand za vezanje na specifične stanične receptore i to na obitelj LDL receptora te za receptore vezane za heparin sulfat proteoglikane (Huang i Mahley, 2014). Protein APOE4 povezan je s AB s kasnim

početkom. APOE je povezan sa stvaranjem amiloidnih plakova u mozgu, što je jedan od karakteristika AB (Liu i sur., 2014).

Tablica 1.3. Geni koji se povezuju uz razvoj AB

Bolest	Gen	Lokus	Protein
AB (Alzheimerova bolest)			
Rana faza	PSEN 1	14q24.3	Presenilin 1
	PSEN 2	1q31-q42	Presenilin 2
	APP	21q21.2	Prekursor amiloidnog proteina
Kasna faza	APOE	19q13.2	Apolipoprotein E

(Preuzeto i prilagođeno: Alzheimer disease & Frontotemporal Dementia Mutation Database, <https://www.alzforum.org/mutations/app>)

1.5. Ostali čimbenici rizika za AB

Osim nasljednih čimbenika rizika, na razvoj AB mogu utjecati razni drugi čimbenici kao što su dob, spol, depresija, pušenje, obiteljna anamneza, povrede mozga, kronične bolesti (povišeni krvni tlak, povišena razina kolesterola, dijabetes tipa 2, prekomjerna tjelesna težina), razina obrazovanja, krvožilne bolesti, nedostatak tjelesne aktivnosti i samoća (Qiu i sur., 2009). Životna dob predstavlja najvažniji čimbenik rizika razvoja AB. AB najčešće nastupa nakon 65. godine života, a sa starošću raste. Volumen hipokampusa smanjuje se brzinom od 4 % – 6 % godišnje u bolesnika s AB (Jack i Holtzman, 2000). Razumijevanje starosne atrofije mozga je važno jer se AB češće javlja u starijoj dobi. Životna dob i AB su neovisni procesi, ali njihovo djelovanje na mozak se dešava istovremeno (Raji i sur., 2009). Dvije trećine oboljelih otpada na žene. Životna dob žena je dulja nego kod muškaraca, a bolest zahvaća uglavnom stariju populaciju. Neurodegenerativne promjene i klinički simptomi javljaju se prije kod žena nego što se posumnja na dijagnozu (Lin i sur., 2015). No progresija AB kod žena može biti posljedica bioloških promjena i ranjivosti u postmenopauzi (Seshadri i sur., 1997). Razina moždanog neurotrofnog čimbenika (BDNF, engl. *brain derived neurotrophic factor*) u cirkulaciji povećava se s tjelesnom aktivnošću i smanjenjem unosa kalorija. BDNF utječe na preživljavanje i funkcioniranje neurona, poboljšava sinaptičku plastičnost i dugoročno pamćenje. Osobe koje imaju najvišu razinu BDNF imaju najnižu razinu demencije u odnosu na osobe s nižom razinom BDNF (Weinstein i sur., 2014). Ljudi koji su bili stariji od 50 godina i

imali problem s pamćenjem su pokazali poboljšanje u kognitivnim sposobnostima nakon tjelesne aktivnosti i tjednog hodanja (Weinstein i sur., 2014), jer se razina BDNF povećava s tjelesnom aktivnošću i tjelovježbom. Osobe koje imaju visoki indeks tjelesne mase (ITM), imaju i veći rizik za razvoj AB od onih koji imaju normalnu tjelesnu težinu (Weinstein i sur., 2014). Redovita tjelesna aktivnost i regulirana tjelesna težina smanjuju rizik za razvoj AB (Weinstein i sur., 2014). Štetni učinci debljine utječu i na vaskularni rizik koji također može utjecati na razvoj AB. Nepovoljan učinak pretilosti na kognitivne funkcije povezuje se s oslabljenim metabolizmom inzulina, što dovodi do poremećaja mehanizma prijenosa glukoze u mozak (Naderali i sur., 2009). Epidemiološki podatci i studije upućuju na vjerojatnu zajedničku patofiziologiju između šećerne bolesti tipa 2 i AB. I dijabetes tipa 2 i AB prevladavaju u starijoj životnoj dobi. Do pogoršanja kognitivne funkcije može doći kao posljedica oštećenja inzulinskih mehanizama što je u skladu s pronađenim smanjenim razinama inzulina u mozgu bolesnika s AB (Frölich i sur., 1998). Povrede glave u ranijoj životnoj dobi, a pogotovo ako se radi o ozbiljnoj povredi praćenoj gubitkom pamćenja, mogu biti čimbenik rizika za AB ili neku drugu vrstu demencije u starijoj životnoj dobi (Fleminger i sur., 2003). Epidemiološki podatci upućuju kako osobe nižeg stupnja obrazovanja ili nezaposlene osobe imaju veću vjerojatnost obolijevanja od AB. Moguće je da su ti razlozi povezani sa slabijim socioekonomskim statusom i s tim povezanim lošim prehrambenim navikama. Pretpostavlja se da teškoće sa suočavanjem u početnom stadiju bolesti nastaju upravo radi slabije moždane aktivnosti (Cadard i sur., 2018).

Rana istraživanja su pokazala da socijalna okolina, osobito socijalni odnosi i potpora mogu imati veliki utjecaj na ponašanje i socijalno zdravlje (Hsiao i sur., 2018). Istraživanja koja su ispitivala povezanost između osamljenosti i vjerojatnosti nastanka AB su pokazala da su osobe koje su bile osamljene imale veći rizik od AB od osoba koje nisu bile osamljene. Također, kod osoba koje su mentalno aktivne i sudjeluju u društvenim i socijalnim aktivnostima, kognitivni pad i početak AB može se odgoditi (Hsiao i sur., 2018).

1.6. Rani simptomi bolesti

Bolest obično počinje promjenama kratkoročne memorije (epizodičko pamćenje), zaboravljivošću i blagom konfuzijom koja se očituje kao zaboravljivost za nedavne događaje (Awada i sur., 2015). Dolazi do nesnalaženja u vremenu i osobe zaboravljaju koji je dan, ne znaju koji je datum ili godina. Nakon toga se dešavaju poteškoće u snalaženju u prostoru i osobe

ne znaju pronaći put do posla ili kuće, a često ne znaju, tj. zaborave gdje su uopće krenule. Postepeno se javlja psihičko i fizičko propadanje, oboljeli su slabije pokretni i taj proces napreduje do potpune nepokretnosti. U tim fazama AB prevladava potpuna funkcionalna onesposobljenost bolesnika i najčešće su takve osobe potpuno ovisne o tuđoj skrbi i njezi (Hugo i sur., 2014).

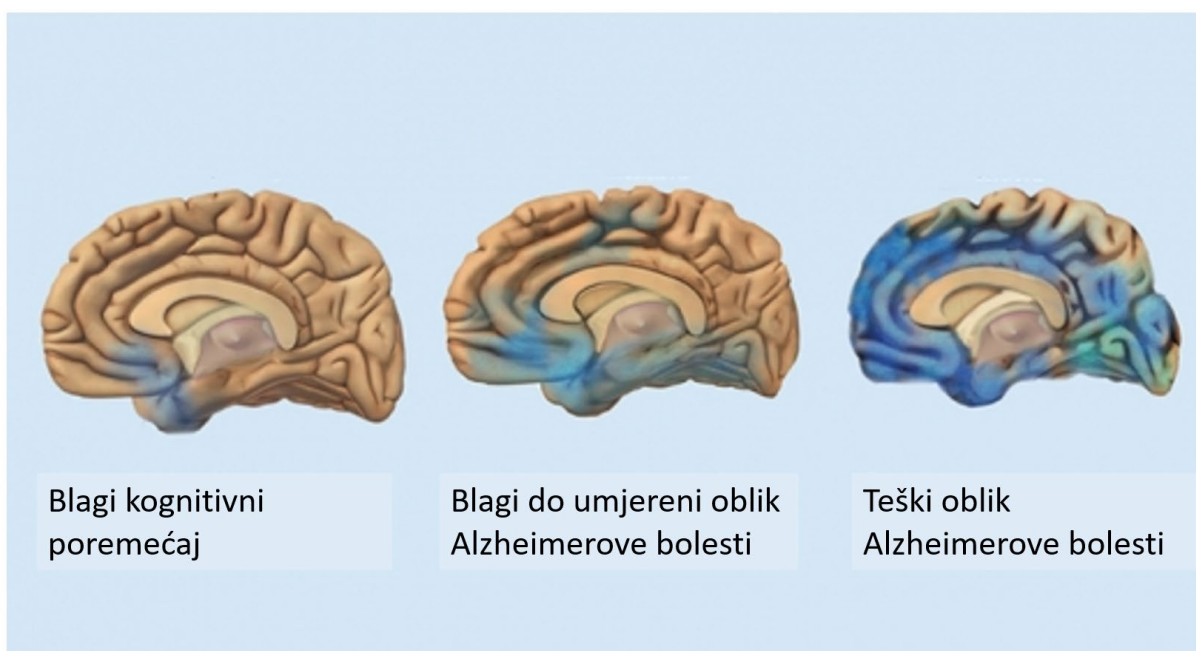
1.6.1. Kognitivni znaci AB

Kognitivni znaci AB su otežana koncentracija; smetnje pamćenja - zaboravljivost, ponavljanje istih pitanja, teškoće u izražavanju, zametanje predmeta svakodnevne upotrebe, usporenost, neprepoznavanje bliskih osoba, gubitak društvene procjene koja se ogleda u nekritičnosti; te smanjenje mentalne fleksibilnosti (Neugroschl i Wang, 2011).

Postoje tri stadija AB - to su rani, srednji i kasni stadij, dok se u medicinskom kontekstu ponekad prikazuju kao blagi, umjereni i teški stadij ili oblik AB (Sjögren i Larsson, 1959). AB se ne razvija kod svih osoba na isti način, pa tako i svaka oboljela osoba pokazuje znakove bolesti individualno. Do promjena u mozgu može doći i ranije, znatno prije nego što se pokažu vidljivi simptomi bolesti. Ta faza može trajati duže vrijeme, a naziva se pretklinička AB (Knopman i sur., 2012). Kad se postavi dijagnoza AB, osoba nakon toga može živjeti u prosjeku od četiri do osam godina, međutim neke osobe žive čak i do 20 godina nakon dijagnosticiranja AB, što ovisi o životnoj dobi i o drugim životnim i zdravstvenim okolnostima i navikama (Ravi i sur., 2011). Iako se mogu utvrditi tri faze AB, simptomi se često preklapaju i nekad je teško ocijeniti u koju fazu oboljela osoba spada. Početni ili rani stadij je faza bolesti u kojoj osoba još uvijek može samostalno funkcionirati (Galasko i sur., 1998). Osoba može raditi, upravljati vozilima, sudjelovati u radnim i društvenim aktivnostima. Simptomi nisu tako uočljivi, ali obitelj ili bliske osobe mogu primijetiti početne promjene. U tom periodu važno je prepoznati te rane simptome i obavijestiti liječnika, koji će uz pomoć dijagnostičkih alata utvrditi radi li se o AB. Rani stadij obilježen je poremećajem epizodičkog pamćenja. Prvi znakovi u tom stadiju mogu se primijetiti u gubitku sposobnosti za izražavanje u normalnom razgovoru i osoba se ne može sjetiti odgovarajućih riječi (anomička disfazija). Radi te nemogućnosti, osoba pokušava na drugi način izreći misli i razvija i logoreju, tj. bolesnu brbljavost, karakteriziranu bujicom riječi, ubrzanim i obilatim tijekom riječi, najčešće nepovezanih. Dolazi do poteškoća u pamćenju imena kada se osoba upoznaje s novim ljudima te do zaboravljivosti upravo pročitanih podataka. Uobičajene svakodnevne radne ili društvene aktivnosti mogu oboljeloj osobi predstavljati poteškoće. Osoba se ne može sjetiti gdje je ostavila pojedine stvari, a

pojavljaju se problemi s planiranjem i organiziranjem. Također se u oko 10 % oboljelih može javiti izgubljenost u vremenu i prostoru. U ranom stadiju demencije pojedine osobe shvaćaju da se nešto događa (Hamdy i sur., 2017). Neke osobe čak pokušavaju prikriti simptome ili koriste razne načine da to prikriju, kao što su podsjetnici ili bilješke. U ranoj fazi uz pomoć obitelji i pod nadzorom liječnika osoba može uspješno organizirati svoj svakodnevni život. Druga, umjereni ili srednja faza obilježena je napredovanjem demencije i sve većim izražavanjem apraksije, agnozije i afazije. Semantičko pamćenje slabi, a sjećanje na davne događaje je obično još sačuvano (Irish i sur., 2013). Osobe pokazuju povećanu konfuziju i pogoršava se moć prosudbe. Pokazuju se poteškoće u orijentaciji i osoba više niti ne zna na kojem mjestu se nalazi, niti se može sjetiti koji je dan. Javljaju se poteškoće s osnovnim podacima kao što su adresa, mjesto stanovanja ili brojevi telefona, kao i s nekim važnijim individualnim datumima kao što su rođendani i godišnjice. Povećana je mogućnost da osobe izađu izvan stana, kuće, prebivališta i ne znaju se vratiti. U ovoj fazi takva osoba zahtijeva veću pomoć, čak i kod nekih osnovnih svakodnevnih radnji kao što su oblačenje i održavanje osobne higijene. Uz sve te kognitivne simptome se često mogu javiti i anksioznost, depresija i agresivnost (Fauth i sur., 2016).

U trećem stadiju, u teškoj ili kasnoj fazi AB, najčešće dolazi do gubitka i epizodičkog i semantičkog pamćenja. Dolazi do gubitka tjelesnih sposobnosti, vidljive su poteškoće s jedenjem i gutanjem, osobe teško kontroliraju mjehur i crijeva, kretanje je otežano i na kraju ta faza obično završava s nemogućnošću gutanja, hodanja i kretanja. U ovoj fazi oboljele osobe zahtijevaju stalnu njegu i pažnju. Javljaju se česte infekcije, najčešće upala pluća, što na kraju i bude čest uzrok smrti dementnih osoba. Uobičajene, svakodnevne radnje postaju skoro nemoguće i oboljeli postaju potpuno ovisni o brizi drugih. (Palsetia i sur., 2018).



Slika 1.5. Progresija Alzheimerove bolesti, (Preuzeto i prilagođeno: <https://www.faim.org/dementia-and-alzheimers-disease>)

Osim ove podijele AB u 3 stadija ili faze (Slika 1.5.), koriste se i različite psihometrijske ljestvice ili skale za procjenu različitih stadija AB.

1.6.2. Skale za ocjenu kognitivne funkcije

Mini-mental test ili MMSE (engl. *Mini-mental test*) je psihometrijski test za testiranje ispitanika na demenciju koji sadrži maksimalno 30 bodova. Ovim testom procjenjuje se memorija, pažnja, budnost, govor, orijentacija, razumijevanje, čitanje i pisanje, imenovanje i ponavljanje. Odgovori se boduju s nula bodova ili s jednim bodom. Prije samog testiranja nužno je provjeriti stupanj obrazovanja ispitanika. Istraživanja upućuju da je stupanj obrazovanja povezan s rezultatima testa. Prema broju bodova na MMSE testu osobe se mogu rangirati u nekoliko grupa:

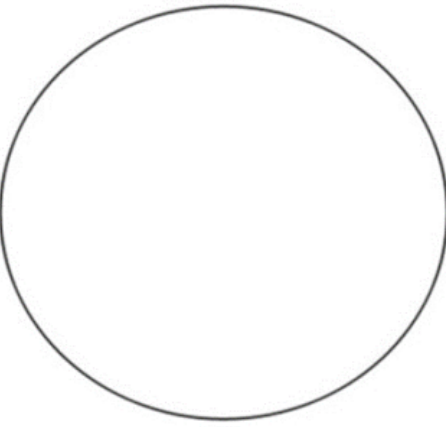
- normalna kognitivna sposobnost (od 27 – 30 bodova)
- blaga demencija (od 21 – 26 bodova)
- umjeren demencija (od 10 – 20 bodova)
- teški oblik demencije (manje od 10 bodova)

Tablica 1.4. Mini-mental test

Mini-mental test		
Ime i prezime:		
Datum:		
Mogući bodovi	Bodovi ispitanika	Pitanja
5 (1 po odgovoru)		VREMENSKA ORIJENTACIJA Godina? Godišnje doba? Mjesec? Datum? Dan?
5 (1 po odgovoru)		PROSTORNA ORIJENTACIJA Država? Grad? Ulica? Zgrada? Kat?
3 (1 po odgovoru)		REGISTRIRANJE POJMOVA Nabrojati tri stvari
5 (1 po odgovoru)		PAŽNJA I RAČUNANJE Oduzimanje brojeva, čitanje unatrag
3 (1 po odgovoru)		PAMĆENJE Ponoviti tri prije imenovana pojma
		JEZIK
2 (1 po odgovoru)		IMENOVANJE (2 predmeta imenovati)
1 bod		PONAVLJANJE FRAZE (nema ako, ali, zašto)
3 (1 po stupnju)		USMENA ZAPOVIJED (3 stupnja) (uzeti papir u ruku, presavinuti papir, staviti ga na stol)
1		PISANA ZAPOVIJED (zatvorite oči)
1		REČENICA (napisati rečenicu sa subjektom i glagolom)
1		VIDNO PROSTORNI TEST (dati pacijentu prazan papir da nacрта dva peterokuta čiji kutovi se sjeku)
30 (ukupno)		

Test crtanja sata ili CDT (engl. *Clock Drawing Test*) koristi se kao još jedan test za procjenu ozbiljnosti demencije, a vrijeme potrebno da se taj test ispuni je vrlo kratko (Sunderland i sur., 1989). Pacijent dobije nacrtanu kružnicu u koju mora upisati brojeve i kazaljke sata koji pokazuju neko vrijeme, najčešće se zadaje vrijeme od 11 sati i 10 minuta. Ocjenjuje se crtanje kruga (1 bod), brojeva (2 boda) i kazaljki s točnim vremenom (2 boda). Ukoliko osoba nacrtat sat, kazaljke i točno vrijeme ocjenjuje se kao 5/5 bez kognitivnih oštećenja. Ukoliko je rezultat od 0 – 4 boda, nalaz govori da se radi o poremećaju pamćenja i upućuje se na daljnje ispitivanje. Postoje različiti sustavi ocijenjivanja sata, a glavni aspekti koji se moraju razmotriti su ispravan položaj brojeva 12, 3, 6 i 9 kao i ispravno namještene kazaljke npr. 10 minuta iza 11 sati (Brodaty i sur., 2002). Test crtanja sata koristi se kao jedan od testova probira. Osim toga, može se primijeniti kao dio većeg protokola procjene kognicije (*Addenbrooke's cognitive examination – ACE-R, Final Revised Version A 2005*).

TEST CRTANJA SATA



Bodovanje:

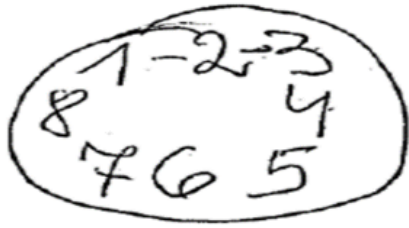
Prema navedenoj shemi od 5 bodova

KRUG **1 bod** ukoliko je krug nacrtan

BROJEVI **2 boda** ukoliko su svi brojevi dobro napisani i raspoređeni
1 bod ukoliko su svi brojevi dobro napisani, a nisu dobro raspoređeni

KAZALJKE **2 boda** ukoliko su obje kazaljke dobro nacrtane, različite dužine i pokazuju na zadane brojeve
1 bod ukoliko obje kazaljke pokazuju na zadane brojeve, ali su pogrešne dužine *II*
1 bod ukoliko jedna kazaljka pokazuje na dobar broj i dobre je dužine *II*
1 bod ukoliko je nacrtana samo jedna kazaljka i pokazuje na dobar broj (npr. na 11 za jedanaest i petnaest)

Slika 1.6. Test crtanja sata (*Preuzeto i prilagođeno: Addenbrooke's cognitive examination – ACE-R, Final Revised Version A 2005*)

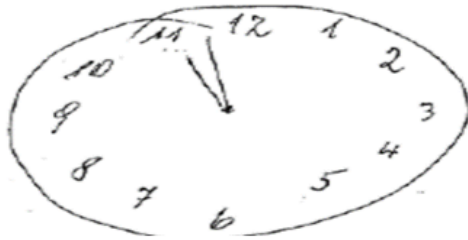


Žensko, 82 godine, MMSE 14

Loše pogreške na testu crtanja sata
0 ponovljenih riječi



Vrlo jaka sumnja u demenciju
Preporuča se daljnja obrada

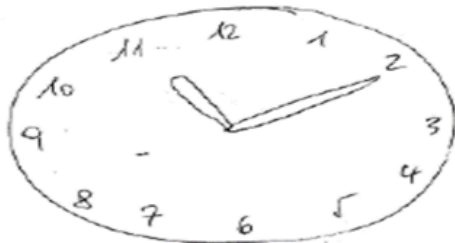


Muško, 83 godine, MMSE 25

Blage greške na testu crtanja sata
1-2 ponovljene riječi



Sumnja na demenciju
Preporuča se daljnja obrada



Žensko, 64 godine. MMSE 30

Odličan test crtanja sata
3 ponovljene riječi



Nema sumnje u demenciju
Kontrola za jednu godinu

Slika 1.7. Rezultati testa crtanja sata, (Preuzeto i prilagođeno: https://www.researchgate.net/figure/Examples-of-three-different-CDT-results_fig1_223959731)

1.6.2.1 Test funkcionalnog ocjenjivanja (FAST)

Tablica. 1.5. Skala funkcionalnog ocjenjivanja (FAST)

Test funkcionalnog ocjenjivanja (FAST, engl. <i>Functional Assessment Test</i>)			
faza	Stanje pacijenta	Razina funkcionalnog pada	Očekivano trajanje faze
Faza 1	Normalna odrasla osoba	Nema funkcionalnog opadanja.	
Faza 2	Normalna odrasla osoba	Osobna svijest o nekom funkcionalnom opadanju.	Nepoznato
Faza 3	Rana Alzheimerova bolest	Primjetni deficiti u zahtjevnim poslovnim situacijama.	Prosječno trajanje ove faze je 7 godina.
Faza 4	Blaga Alzheimerova bolest	Zahtijeva pomoć u složenim zadacima kao što su upravljanje financijama, putovanja, planiranje, itd.	Prosječno trajanje ove faze je 2 godine.
Faza 5	Umjerena Alzheimerova bolest	Zahtijeva pomoć u odabiru odgovarajuće odjeće.	Prosječno trajanje ove faze je 1,5 godina.
Faza 6	Umjereno teška Alzheimerova bolest	Potrebna je pomoć kod oblačenja, kupanja i toaleta. Iskustva urinarne i fekalne inkontinencije.	Prosječno trajanje ove faze je 3,5 mjeseca do 9,5 mjeseci.
Faza 7	Teška Alzheimerova bolest	Sposobnost govora opada na oko pola tuceta razumljivih riječi. Progresivni gubitak sposobnosti hodanja, sjedenja, osmijeha i držanja glave.	Prosječno trajanje ove faze je 1 godina do 1,5 godina.

(Preuzeto i prilagođeno: <https://www.dementiacarecentral.com/aboutdementia/facts/stages/>)

Skala FAST koristi također sustav od sedam stupnjeva koji je fokusiran na razinu funkcioniranja pojedinca i svakodnevnih aktivnosti.

Skala za ocjenu kliničke demencije CDR (engl. *Clinical Dementia Rating Scale*)

Ova skala koristi sustav od 5 stupnjeva. To je najčešće korišten sustav za ocjenu demencije. Liječnik na osnovu intervjua s oboljelim osobom i članom obitelji svrstava oboljelu osobu u jednu od 5 faza.

Tablica 1.6. Skala za ocjenu kliničke demencije

Skala za ocjenu kliničke demencije (CDR)		
Faza	Opis	Očekivano trajanje faze
CDR-0	Nema demencije	
CDR-0,5	Vrlo blaga demencija – Problemi s pamćenjem su neznatni, ali dosljedni. Pojedinci imaju poteškoća s vremenom i rješavanjem problema, a svakodnevni život je neznatno umanjen. Pojedinci su još uvijek u potpunosti sposobni za obavljanje aktivnosti osobne njege.	Prosječno trajanje je nekoliko godina do 7 godina.
CDR-1	Blaga demencija – Gubitak pamćenja je umjeren, osobito za nedavne događaje, i ometa svakodnevne aktivnosti. Pojedinci imaju umjerene poteškoće u rješavanju problema, ne mogu samostalno funkcionirati u poslovima zajednice, a imaju poteškoća sa svakodnevnim aktivnostima i hobijima, osobito složenim.	Prosječno trajanje je 2 godine.
CDR-2	Umjeren demencija – Dublji gubitak pamćenja, samo zadržavanje visoko naučenog materijala. Pojedinci su dezorijentirani s obzirom na vrijeme i mjesto, nedostaju im dobre prosudbe i imaju poteškoća u rješavanju problema. Oni imaju malo ili nimalo neovisne funkcije kod kuće i mogu raditi samo jednostavne poslove i imaju malo interesa.	Prosječno trajanje je nešto manje od 2 godine do 4 godine.
CDR-3	Teška demencija – Teški gubitak pamćenja. Pojedinaac nije orijentiran s obzirom na vrijeme ili mjesto, nema sud ili sposobnost rješavanja problema i ne može sudjelovati u poslovima zajednice izvan kuće. Njima je potrebna pomoć u svim svakodnevnim životnim zadacima i potrebna im je pomoć kod većine osobne njege. Često su inkontinentne.	Prosječno trajanje je 1 godina do 2,5 godine.

(Preuzeto i prilagođeno: <https://www.dementiacarecentral.com/aboutdementia/facts/stages/>)

1.7. Blagi kognitivni poremećaj ili MCI

Blagi kognitivni poremećaj ili MCI (engl. *Mild cognitive impairment*) uzrokuje blagi, ali vidljiv i mjerljiv pad kognitivnih sposobnosti uključujući sposobnosti pamćenja i razmišljanja. Osoba s MCI ima povećani rizik za razvoj AB ili neke druge demencije (Campbell i sur., 2013). MCI predstavlja fazu između očekivanog kognitivnog opadanja i normalnog starenja (Geda, 2012). Može uključivati probleme s pamćenjem, jezikom, razmišljanjem i prosudbama koje su veće od uobičajenih promjena u odnosu na dob. Kognitivni problemi mogu ići dalje od onog što se očekuje za osobe takve starije dobi i mogu biti znak mogućeg MCI. Ti znaci mogu se manifestirati kao:

- sve češće zaboravljanje
- zaboravljanje važnih događaja kao što su sastanci ili društveno angažiranje
- gubljenje tijeka misli ili razgovora
- poteškoće u donošenju odluka, planiranja koraka ili razumijevanja uputa
- problem s orijentacijom i pronalaženjem okoline
- sve lošija prosudba
- okolina i obitelj počnu primjećivati promjene

Ako je osoba razvila MCI, može prolaziti kroz stanja depresije, razdražljivosti, agresivnosti i anksioznosti. Simptomi MCI mogu ostati nepromijenjeni godinama, mogu napredovati prema AB ili nekoj drugoj demenciji ili se simptomi tijekom vremena mogu poboljšati. Istraživanja pokazuju da se MCI često, ali ne uvijek razvija iz manjeg stupnja istih tipova promjena u mozgu koji se mogu zamijetiti kod AB ili nekih drugih demencija (Knopman i sur., 2015). Starenjem se povećava kognitivno propadanje (Rubin i sur., 1998). Kako osoba stari kvaliteta kognitivnih funkcija postaje sve važnija tema. Starije osobe mogu pokazivati vidljivo kognitivno oštećenje, a da nije došlo do prijelaska u demenciju (Lopez, 2013). Blagi kognitivni spoznajni poremećaj može prethoditi ili pratiti veliki broj somatskih poremećaja i bolesti. Može se definirati kao poremećaj kod osobe koja u svom ponašanju pokazuje kognitivni poremećaj, a ne ispunjava još kriterije za postavljanje dijagnoze AB i još uvijek nije dementna (Petersen i sur., 1999). Kognitivne sposobnosti odnose se na nekoliko kognitivnih područja:

- pamćenje, govor i jezik
- pozornost i pažnja
- vizualne funkcije

Nekad je vrlo teško prepoznati znakove MCI. Ovo stanje uključuje blaga kognitivna oštećenja i početak poremećaja pamćenja (Flicker i sur., 1991). Osobe kod kojih se utvrdi prisutnost MCI imaju povećani rizik za razvoj AB (Boyle i sur., 2006).

MCI je kao pojam postupno ušao u opise starenja i demencije (Golomb i sur., 2004). Pacijenti s kognitivnim oštećenjima zbog povećanog rizika za razvoj AB predstavljaju skupinu od značajnog interesa radi njihove kliničke karakterizacije i razumijevanja patofiziologije prijelaza MCI u AB. Istraživanja pokazuju da bolesnici iz MCI u AB prelaze po stopi od 10 – 15 % godišnje, a da 80 % bolesnika prelazi u stanje AB (Petersen i sur., 1999). Kriteriji kojih se kliničari trebaju držati kod postavljanja dijagnoze MCI su postavljeni u Američkom Nacionalnom Institutu za starenje i Alzheimerovu bolest (engl. *American National Institute on Aging and Alzheimer's disease*). Ti kriteriji uključuju validirane neuropsihološke testove koji su trenutno dostupni. MCI može biti posljedica drugih uzroka, a ne samo pred-demencijska faza bolesti. Sindrom MCI odnosi se na sljedeće promjene - promjene u odnosu na prethodno funkcioniranje, oštećenje jedne ili više kognitivnih funkcija poput pamćenja i rješavanja problema. Sposobnost samostalnog funkcioniranja u samostalnom životu je očuvana. Iako neki složeniji zadaci predstavljaju poteškoće u odnosu na prijašnje stanje, nema vidljive demencije. Prepoznavanje kognitivnog oštećenja postaje sve veći izazov za kliničare. U zadnja dva desetljeća poseban je naglasak u procjenjivanju osoba za koje se sumnja da boluju od AB, od MCI do predkliničkog oblika AB u kojem su osobe kognitivno normalne, ali su nositelji značajki AB (Sperling i sur., 2011). MCI se općenito smatra graničnim područjem između kognitivnih promjena starenja i vrlo rane demencije, ali još uvijek predstavlja teškoću u dijagnostici u kliničkoj praksi. Pojam MCI se u literaturi prvi puta spominje prije četiri desetljeća kada grupa autora opisuje promjene u ponašanju osoba koje žive u zajednici i ta oštećenja povezuju s dobi i primarnom degenerativnom demencijom (Gauthier i sur., 2006). Godine 1999. grupa autora s klinike Mayo opisuje oštećenja osoba teže od onog koje bi se očekivalo za njihovu dob gdje se mogu primijetiti neznatni znakovi poremećaja pamćenja, ali te osobe nisu ispunjavale kriterije za demenciju (Petersen i sur., 1999).

1.8. Upala

Obrambeni imunološki mehanizam tijela razvijao se tijekom filogenijskog razvoja (Okin i Medzhitov, 2012). Upala je važan čimbenik obrane i odgovora organizma na različite patogene u cilju očuvanja integriteta organizma. Upala predstavlja uvod u svaku specifičnu imunološku reakciju (Chaplin, 2010). Nespecifična obrana se temelji na različitim mehanizmima kao što su

anatomska barijera kože i sluznice koje predstavljaju mehaničku zaštitu. Osim kože i sluznice u nespecifičnoj obrani sudjeluju i kemijske tvari u sekretima na površinama. Fiziološke značajke koje doprinose obrani domaćina su tjelesna temperatura ili vrućica, sadržaj kisika ili pH u tkivima. Također, različite tvari koje se nalaze u izvanstaničnoj tekućini kao što su kompleменти, interferoni, lizozimi, beta-lizini, C-reaktivni proteini i drugi, imaju ulogu u nespecifičnoj obrani (Sproston i Ashworth, 2018). Upala se definira i kao niz složenih reakcija koje se javljaju kao odgovor živog organizma na mehaničke ozljede ili bilo koje djelovanje kemijskog ili biološkog porijekla, djelovanje patogenih mikroorganizama ili toksičnih tvari (Schmid-Schonbein, 2006). Prema tijeku, upale se dijele na akutne i kronične. Akutna upala kratko traje i može završiti iscjeljenjem uz potpuni oporavak. Ako ne dođe do iscjeljenja, akutna upala prelazi u kroničnu. Kronične upale se odlikuju specifičnim humoralnim i staničnim odgovorom. U upalnom odgovoru djeluju medijatori sustavne upale (Chen i sur., 2018). Ti medijatori su odgovorni za aktivnost stanica u napadnutom tkivu i to su endotelne stanice, tkivni makrofagi i fibroblasti. Odgovorni su i za aktivnost nastalih upalnih stanica (limfociti T i B, NK stanice, neutrofil, monociti, eozinofili). Rani stanični medijatori kao što su histamin (aktiviraju ga bazofili i mastociti), serotonin (smješten je u trombocitima), citokini (koje otpuštaju makrofagi i limfociti T), kemokini (koje otpuštaju endotelne stanice, monociti i limfociti T), limfociti T i makrofagi čine najvažnije dijelove imunološkog sustava, koji u doticaju s antigenom proizvode specifična protutijela (Abdulkhaleq i sur., 2018). Te stanice reagiraju na razne signale, podražaje i nadražujuće tvari upalnim odgovorom. Stanice u mozgu, mikroglia, namjenjene su zaštiti mozga i imaju mogućnost fagocitoze. Svojim djelovanjem štite neurone SŽS-a (Hong i sur., 2016). Stvaranjem agregata β -amiloidnih peptida aktivira se mikroglia koja mijenja svoj izgled iz razgranatog u aktivirani (Sondag i sur., 2009). Fagocitna mikroglia svojim profagocitnim djelovanjem razara amiloidne agregate (Doty i sur., 2015). Novonastala mikroglia može imati neurotoksičan učinak i otpuštati reaktivne kisikove spojeve ili ROS, citokine (interleukin 1 alfa ili IL-1 α i čimbenik nekroze tumora alfa ili TNF- α) i takvim upalnim djelovanjem oštetiti neurone.

1.8.1. Upala i AB

Istraživanja u posljednjem desetljeću su dovela do velikih pomaka u razumijevanju povezanosti između imunološkog odgovora i AB. Upala ima dvostruki učinak, s jedne strane štiti, s druge strane ima destruktivni učinak na SŽS. Ključnu ulogu u inicijaciji i procesu neurodegeneracije u AB ima upala (Glass i sur., 2010).

Upalna komponenta dugo vremena je prepoznata u AB i prvo se vjerovalo da upala nastaje kao odgovor na taloženje A β , te da ima zaštitnu funkciju. Utvrđeno je da postoji povezanost između

AB i mutacije u genima odgovornih za imunološke odgovore CR1, CD33, MS4A, ABCA7, EPHA1, TREM2 i CLU (Giri i sur., 2016). Poznato je da kronični upalni proces prati AB. Međutim, ostaje nejasno je li upala reakcija na patologiju AB ili doprinos nastanku ili progresiji bolesti (Combarros i sur., 2009). Taj je mehanizam potkrijepljen i činjenicom da postoji smanjena incidencija AB u bolesnika koji dugotrajno primaju nesteroidne protuupalne lijekove (Ma i sur., 2005). Istraživanje u studiji na 1050 osoba u sklopu Honolulu-Azijske studije starenja pokazalo je povezanost između upale u srednjim godinama i demencije u starijoj dobi. U studiji se ističe da upalni markeri mogu odražavati ne samo periferne bolesti, nego i mehanizme cerebralne bolesti povezane s demencijom, te da su ti procesi mjerljivi i prije nego što se pojave prvi klinički simptomi (Schmidt i sur., 2002). Slično istraživanje provedeno je u Baltimoreu na 1532 sudionika gdje su također mjerene razine upalnih markera i magnetskom rezonancijom (MR) su skenirane promjene na mozgu (Walker i sur., 2017). Osobe koje su imale povišene razine upalnih markera imale su 5 % smanjen volumen mozga u područjima mozga povezanog s AB, uključujući i hipokampus (Schmidt i sur., 2016). Rezultati istraživanja pokazuju da upalni procesi koji se događaju godinama ranije utječu na promjene u mozgu koje su povezane s AB i drugim oblicima demencije (Walker i sur., 2017).

Liječenje i prevencija kroničnih upala vrlo je važan korak u otklanjanju rizika za demenciju. Neka istraživanja pokazuju da se poboljšanja kognitivnih poremećaja mogu postići blokadom upalnih proteina koji se oslobađaju u mozgu aktiviranjem mikroglia (Mandrekar i sur., 2013). Identificiranje upalnih markera mozga omogućit će bolje razumijevanje AB i upalnog odgovora organizma. Krajnji cilj je istražiti lijekove koji će smanjiti aktivnost mikroglia i omogućiti uklanjanje amiloidnih plakova uz što manje negativnog učinka (Heneka i sur., 2015).

Određivanje biomarkera u perifernoj krvi predstavlja danas brojne izazove koji zahtijevaju osjetljive i specifične analize i pažljivu provjeru valjanosti. Biomarkeri iz mozga obično su prisutni u relativno niskim koncentracijama u krvi zbog krvno-moždane barijere koja sprečava normalan prolaz molekula između SŽS-a i krvne cirkulacije (Zetterberg i sur., 2019).

1.9. Citokini

Citokini su stanične signalne molekule koje omogućavaju staničnu komunikaciju u imunološkim odgovorima i stimuliraju kretanje stanica prema mjestima upale, infekcije i traume. Po strukturi su proteini, polipeptidi ili glikopeptidi, razmjerno niske molekularne

molekularne mase od 60 – 70 kDa (Holdsworth i Gan, 2015). Citokini predstavljaju veliku grupu farmakološki aktivnih proteina koji preko svojih specifičnih receptora djeluju u stanici i na staničnoj membrani kao medijatori i regulatori stanične komunikacije. Ti proteini stupaju u interakciju sa stanicama imunološkog sustava u cilju regulacije reakcije tijela na bolest i infekcije, kao i posredovanja u normalnim staničnim procesima u tijelu. Izlučuju se iz imunoloških stanica i nekih drugih tipova stanica koji potiču upalu. Omogućuju razmjenu informacija imunološkog sustava i stanica tkiva domaćina. Kada se imunološki sustav bori protiv patogena, citokini signaliziraju imunološkim stanicama poput T stanica i makrofaga da putuju do mjesta infekcije. Isto tako, citokini aktiviraju te stanice, potičući ih da stvaraju više citokina (Arango i Descoteaux., 2014). Vežu se za komplementarna mjesta na membrani stanice. Citokini djeluju preko složenog puta signala na način da šalju informaciju ciljnoj stanici, koja putem te informacije potiče odgovarajući receptor. Receptor šalje signal u stanicu primatelja što dovodi do promjene funkcije ili fenotipa stanice (Rubio-Perez i sur., 2012). Djelovanje citokina mogu zaustaviti inhibitori mijenjajući biološku aktivnost citokina ili sprječavanjem odgovora ciljne stanice. To djelovanje može se desiti i u fiziološkim i u patološkim uvjetima. Citokini djeluju parakrino što znači da utječu na funkciju drugih stanica ili autokrino što znači da djeluje na funkciju vlastite stanice koja ga izlučuje. Ukoliko citokini putuju kroz cirkulaciju do ciljne stanice u drugim dijelovima tijela, to se djelovanje može opisati kao endokrino. Mogu djelovati pozitivno ili negativno u reguliranju imunološke reakcije (Szelényi i sur., 2001). Biološka aktivnost citokina u mnogim slučajevima je višestruka. Različiti citokini mogu imati isto djelovanje, što omogućava funkcioniranje imunološkog sustava i upalnog sustava i u slučajevima gubitka funkcije pojedinih citokina.

Citokini mogu regulirati staničnu aktivnost na nekoliko načina:

- pleiotrofija – jedan citokin ima mnogo različitih funkcija
- redundancija – nekoliko različitih citokina može posredovati iste ili slične funkcije
- sinergizam – kombinirani učinak dva citokina na staničnu aktivnost veći je od učinka pojedinog citokina
- antagonizam – učinci jednog citokina inhibiraju ili kompenziraju učinke drugih citokina

Funkcije citokina uključuju sudjelovanje u akutnoj upali, kroničnoj upali i regulaciji metaboličkih puteva unutar stanica mišića, masnog tkiva, SŽS-a i jetre.

Tablica 1.7. Odabrani citokini, glavni izvor i njihova primarna aktivnost

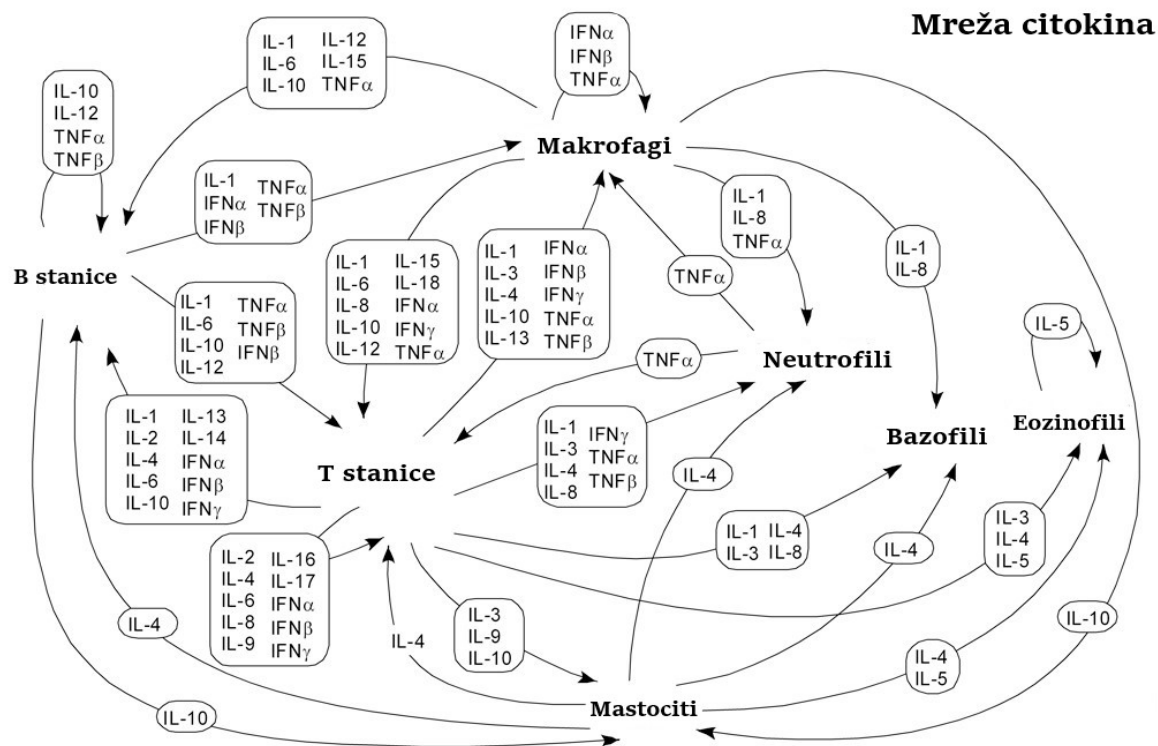
Citokini	Glavni izvor	Primarna aktivnost
IL-1 α	Makrofagi i druge antigen prezentirajuće stanice (APC)	Kostimulacija APC i T stanica, upala i vrućica, odgovor akutne faze, hematopoeza
IL-1 β		
IL-2	Aktivirane Th1 stanice, NK stanice	Proliferacija B stanica i aktiviranih T stanica, NK funkcija
IL-3	Aktivirane T stanice	Rast hematopoetskih i progenitornih stanica
IL-4	Aktivirane T stanice	Proliferacija B stanica, rast i funkcija eozinofila i mastocita, IgE (imunoglobulin E) i MHC (engl. <i>major histocompatibility complex</i>) ekspresije klase II na B stanicama, inhibicija proizvodnje monokina
IL-5	Th2 i mastociti	Eozinofilni rast i funkcija
IL-6	Aktivirane Th2 stanice, APC, druge somatske stanice	Odgovor akutne faze, proliferacija B stanica, trombopoeza, sinergija s IL-1 i TNF na T stanicama
IL-7	Thymic i stromalne stanice koštane srži	T i B limfopoeza
IL-8	Makrofagi, somatske stanice	Kemoatraktant za neutrofile i T-stanice
IL-9	T-stanice	Hematopoetski i timopoetski učinci
IL-10	Aktivirane Th2 stanice, CD8+ T i B stanice, makrofagi	Inhibira proizvodnju citokina, potiče proliferaciju B stanica i proizvodnju antitijela, suzbija stanični imunitet, rast mastocita
IL-11	Atromalne stanice	Sinergistički hematopoetski i trombopoetski učinci
IL-12	B stanice, makrofagi	Proliferacija NK stanica, proizvodnja IFN-a, promiče imunološke funkcije posredovane stanicama
IL-13	Th2 stanice	Aktivnosti slične IL-4
IL-18	Makrofagi	Inducira proizvodnju interferona- γ iz Th1 stanica

IFN- α	Makrofagi, neutrofil i neke somatske stanice	Antivirusni učinci, indukcija klase 1 MHC na sve somatske stanice, aktivacija NK stanica i makrofaga
IFN- β		
IFN- γ	Aktivirane Th1 i Nk stanice	Uvodi MHC klase 1 na sve somatske stanice, inducira MHC klase II na APC i somatske stanice, aktivira makrofage, neutrofile, NK stanice, potiče stanični imunitet, antivirusne učinke
MIP-1 α	Makrofagi	Kemotaksije
MIP-1 β	Limfociti	Kemotaksije
TGF- β	T-stanice, monociti	Kemotaksija, sinteza IL-1, sinteza IgA (imunoglobulin A), inhibiraju proliferaciju
TNF- α	Makrofagi, mastociti, NK (eng. <i>natural killer</i>) stanice, senzorni neuroni	Stanična smrt, upala, bol
TNF- β	Th1 i Tc stanice	Fagocitoza, proizvodnja NO, stanična smrt

Kratice: IL-1 α (interleukin 1 α); IL-1 β (interleukin 1 β); IL-1 (interleukin-1); IL-2 (interleukin-2); IL-3 (interleukin-3); IL-4 (interleukin-4); IL-5 (interleukin-5); IL-6 (interleukin-7); IL-8 (interleukin-8); IL-9 (interleukin-9); IL-10 (interleukin-10); IL-11 (interleukin-11); IL-12 (interleukin-12); IL-13 (interleukin-13); IL-18 (interleukin-18); IFN- α (interferon- α); IFN- β (interferon- β); IFN- γ (interferon- γ); MIP-1 α (makrofagna inflamatorna bjelančevina 1 α); MIP-1 β (makrofagna inflamatorna bjelančevina 1 β); TGF (transformirajući čimbenik rasta beta); TNF- α (čimbenik tumorske nekroze α); TNF- β (čimbenik tumorske nekroze β); Th 1 (engl. T helper type 1), Tc (engl. cytotoxic T cells); NO (dušikov monoksid); APC (antigen prezentirajuće stanice); NK stanice (engl. natural killer); CD8+ (citotoksične T stanice).

Sve stanice s jezgrom u humanom organizmu luče citokine (Zhang i sur., 2007). Oni su proizvod različitih stanica i bez njihove aktivnosti nema ni imunološkog odgovora. Citokini reguliraju širok raspon bioloških funkcija uključujući urođenu i stečenu imunost, hematopoezu, upalu i popravak te proliferaciju uglavnom izvanstanične signalizacije. Njihovo stvaranje ovisno je o stupnju diferencijacije i aktivacije stanice. Citokini su pleiotropni jer djeluju na različite tipove stanica izazivajući različit učinak (Zhang i sur., 2007). Biološka ekspresija različitih citokina dovodi do kaskadnih reakcija, koje djeluju kao potentni induktori drugih citokina. Citokinska informacija se prenosi na membrani stanice putem odgovarajućeg receptora. Neki od ovih receptora su stalno prisutni, a neki se aktiviraju aktiviranjem stanice. Antigen specifičnom aktivacijom limfocita T4 potaknuto je stvaranje različitih citokina

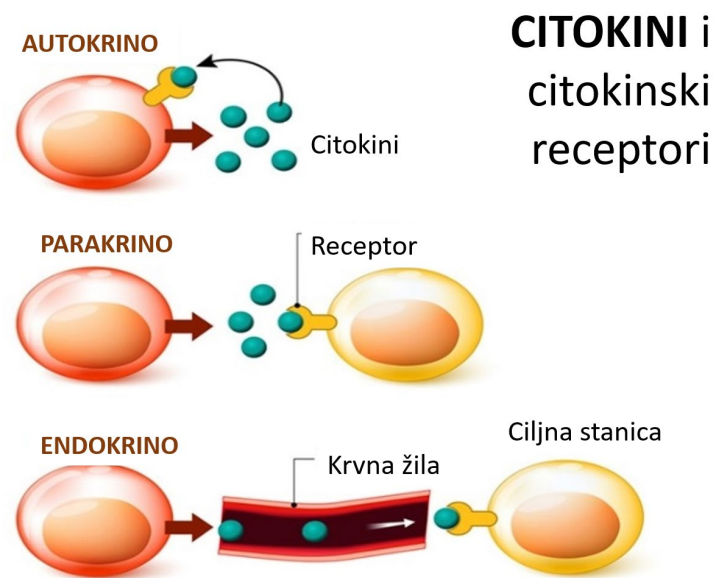
(Luckheeram i sur., 2012). Glavni regulatori imunološke reakcije su limfociti T4 ili pomoćnički limfociti T i njihovi citokini. Riječ *citokini* ima grčko podrijetlo i izvedena je od riječi *cytos* što znači stanica i riječi *kinos* što znači kretati se. Interakcija među stanicama omogućuje djelovanje citokina koje se sastoji u prijenosu poruka i signala, povezivanja i usklađivanja staničnog djelovanja. Nakon što se molekula citokina oslobodi iz stanice, veže se za odgovarajući citokinski receptor na ciljnoj stanici i tako započinje njegovo djelovanje (Nagae i sur., 2016). Signal koji se stvara provodi se do jezgre ciljne stanice, gdje se aktivira određeni gen. Ovisno o genu koji je aktiviran može doći do aktiviranja ciljne stanice, njene proliferacije, diferencijacije, nove stanične funkcije, mogućnosti sinteze novih molekula, ili kemotaksije. Novostvoreni višak citokina koji se nije vezao za stanične receptore, odstranjuje se molekulama neutralizacijskog učinka. Sintezu i otpuštanje citokina mogu zaustaviti inhibitori modulirajući biološku aktivnost citokina ili inhibirajući sposobnost odgovora ciljne stanice (Zheng i sur., 2016). Nekontrolirano lučenje citokina u visokim koncentracijama izaziva toksičan učinak, ponekad s letalnim ishodom. Prije pedesetak godina, kada su otkriveni prvi citokini, prevladavalo je mišljenje da svi citokini imaju slično djelovanje, ali je to mišljenje odbačeno jer se pokazalo da djeluju na različite vrste stanica (Dinarello i sur., 2007). TNF- α je zadržao svoj naziv, iako osim nekroze tumorskih stanica ima različito djelovanje na različite vrste leukocita. Neuroupalna događanja predstavljaju glavne odlike AB gdje su mikroglije prekomjerno aktivirane što za posljedicu ima povećano stvaranje proupalnih citokina (Su i sur., 2016). Prekomjerna aktivacija mikroglija nalazi se u bolesnika s AB i na animalnim modelima AB (Cagnin i sur., 2001).



Slika 1.8. Shematski prikaz mreže citokina, (Preuzeto i prilagođeno: Zhang JM, An J. *Cytokines, inflammation, and pain. Int Anesthesiol Clin. 2007;45(2):27-37*)

Danas je poznato više od 100 različitih citokina (Dinarello, 2007). Citokini obuhvaćaju limfokine (citokine koje proizvode limfociti), monokine (citokine koje proizvode monociti), kemokine (citokine s kemotaksičnim djelovanjem) i interleukine (produkte leukocita koji djeluju na druge leukocite). Citokini se mogu razvrstati u nekoliko različitih skupina ovisno o tipu stanica iz kojih se izlučuju, o njihovoj funkciji i cilju na koji djeluju. Izvorni termin je bio interleukin jer se pretpostavljalo da citokini prvenstveno ciljaju leukocite. Pokazalo se da interleukini ne ciljaju samo leukocite i taj izraz se danas koristi za imenovanje novih citokina. Danas je otkriveno 37 interleukina koji su numerirani prema redoslijedu otkrivanja od 1 - 37 (Akdis i sur., 2011). Interleukine uglavnom produciraju T-pomoćne stanice. Interleukini sudjeluju u međusobnoj komunikaciji stanica koje imaju ulogu u imunološkom odgovoru (Dinarello, 2018). Interferoni imaju antiviralnu aktivnost i stvaraju ih leukociti, fibroblasti i T limfociti (Lin i Young, 2014). Čimbenici poticanja rasta kolonija CSF (engl. *Colony stimulating factors*) su hematopoetski čimbenici koji potiču razvoj i diferencijaciju pluripotentnih hematopoetičkih stanica iz matičnih stanica (Zhao i sur., 2013).

Čimbenici poticanja granulocitnih i makrofagnih kolonija GM-CSF (engl. *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) su citokini uključeni u rast i diferencijaciju mijeloičnih i monocitnih stanica, uključujući dendritične stanice, monocite, makrofage i granulocite (Zhao i sur., 2013). Čimbenici rasta i čimbenici tumorske nekroze djeluju na tumorske stanice i uništavaju ih, a stvaraju ih limfociti T i makrofazi (Salomon i sur., 2018). Kemokini su posebna podskupina strukturno srodnih citokina koji induciraju kemotaksiju, migraciju i aktivaciju stanica, a posebice fagocita i limfocita (Bussmann i Raz, 2015).



Slika 1.9. Citokini i citokinski receptori, prijenos signala, (Preuzeto i prilagođeno: https://www.123rf.com/photo_83417372_stock-vector-cytokines-and-cytokine-receptor-signal-transduction-between-cells-endocrine-paracrine-and-autocrine-.html)

1.9.1. Proupalni citokini

Proupalni citokini su opći pojam za imunoregulacijske citokine koji su uključeni u regulaciju upalnih reakcija (Zhang i sur., 2007). Izraz „proupalno” koristi se za opis upalnog stanja, njegovog fenotipa, karakteristika, njegovih markera (citokini, transkripcijski faktori i sl.). Suprotno je regulaciji i resorpciji upala. Proupalni citokini imaju središnju ulogu u upalnim bolestima infektivnog ili neinfektivnog podrijetla (Chen i sur., 2018). Proizvode ih aktivirani makrofagi i T pomoćne stanice i sudjeluju u povećanju upalne reakcije. Ovi citokini imaju ulogu u rješavanju žarišta upale aktivacijom lokalnih i sistemskih upalnih odgovora. Kod širokog spektra infekcija, citokini se oslobađaju kao odgovor organizma i to je poznato kao

proupalni citokinski odgovor. Aktivira se citokinska kaskada protuupalnih citokina koji blokiraju sintezu proupalnih citokina. U većini slučajeva upalni odgovor je uspješno riješen. Međutim prekomjerna proizvodnja citokina može dovesti do povećanja koncentracije citokina u sistemskoj cirkulaciji i imati štetan učinak na domaćina (Chen i sur., 2017). Učinak upalnog odgovora određen je ravnotežom između proupalnih i protuupalnih citokina. Ovi citokini nastaju aktiviranjem makrofaga i sudjeluju u procesima reparacije. Glavni proupalni citokini su TNF- α i IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8 i IL-15. Oni se luče iz makrofaga i mnogih drugih stanica kao što su fibroblasti i endotelne stanice i mogu započeti kaskadu sekundarnih citokina, između ostalih i kemokina. Proupalni citokini, IL-1 i TNF- α , povišeni su u krvi, mozgu i cerebrospinalnoj tekućini bolesnika s AB ili MCI, dok su protuupalni citokini smanjeni (Forlenza i sur., 2009).

1.9.1.1 Interleukin 1

Interleukin 1 (IL-1) ima glavnu ulogu u upalnim i regulatornim mehanizmima i oslobađa proteine akutne faze. Čine ga 2 različita proteina – IL-1 α i IL-1 β , koji prepoznaju isti stanični receptor na aktiviranoj stanici (Matsushima i sur., 1986). Stanice zdravih organizama ne produciraju citokine, no IL-1 ima važnu ulogu u pojačavanju ili snižavanju upalnog odgovora. Djeluje na procese aktivacije makrofaga, monocita, limfocita T, B i NK stanica. Ima ulogu u sintezi TNF- α i IL-6. Luče ga makrofagi, limfociti B, aktivirani limfociti T, fibroblasti, endotelne stanice, astrociti, keratinociti, stanice glatkih mišića i stanice mikroglia (Koch i sur., 1995). Obuhvaća familiju koju čine 3 citokina – dva agonista, IL-1 α i IL-1 β i endogeni IL-1 receptorski antagonist (IL-1ra). IL-1 je snažan proupalni citokin (citokin upalne faze), s mnogobrojnim sistemskim učincima i u mozgu pacijenata s AB dolazi do njegovog prekomjernog eksprimiranja (Mrak i sur., 2000). Prekomjerna ekspresija IL-1 povezana je sa stvaranjem β -amiloidnog plaka i ona u mozgu korelira sa stupnjem progresije plakova, formiranjem neurofibrilarnih snopića i oštećenja DNA u neuronima (Sheng i sur., 1998). IL-1 regulira ekspresiju beta-amiloidnog prekursorskog proteina u neuronima (Goldgaber i sur., 1989). Ovo eksprimiranje dovodi do taloženja A β fragmenata u plakovima kao i oslobađanja izlučnog beta-amiloidnog prekursorskog proteina u neuronima (Buxbaum i sur., 1992).

Povećana ekspresija IL-1 pronađena je u mozgu oboljelih od AB (Griffin i sur., 1989). Interleukin 1, citokin generiran imunološkim odgovorom koji stimulira proliferaciju i reaktivnost astrocita, bio je prisutan i do 30 puta više u glija stanicama u postmortalnom tkivu mozga pacijenata s AB u usporedbi s rezultatima na mozgovima pacijenata slične dobi koji nisu

imali nikakvih kliničkih simptoma AB (Griffin i sur., 1989). Ekspimirani IL-1 potpomaže stvaranje A β plakova što upućuje na povezanost IL-1 i nastanka AB (Sheng i sur. 2001).

1.9.1.2 Čimbenik nekroze tumora, TNF- α

Čimbenik nekroze tumora ili TNF- α je poznat i kao kahektin, i to je značajan citokin u mehanizmu upale kojeg stvaraju makrofagi, fibroblasti, monociti, i limfociti T i B. Inducira stvaranje nekih citokina (IL-6, IL-8, IL-1 i GM-CSF (engl. *Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor*)). TNF- α ima višestruke uloge. Glavni je čimbenik u upalnoj reakciji. Istraživanja na mišjim modelima pokazala su da kronična neuronska ekspresija TNF- α dovodi do povećanja razine amiloid-beta i hiperfosforiliranog tau, kao i mikroglijne aktivacije (Janelins i sur., 2008). Djeluje u kaskadi citokina. TNF- α , citokin koji sudjeluje u sistemske upali, utječe na neurodegenerativne poremećaje kao što je AB (Cheng i sur., 2010). Pronađene su visoke koncentracije TNF- α u mozgu bolesnika koji boluju od neurodegenerativnih poremećaja (Cheng i sur., 2010). Analiza mozga postmortem utvrdila je lokalizaciju TNF- α u amiloidnim plakovima (Dickson, 1997). Ljudski mozak sadrži stanice mikroglija i astrociti koje se aktiviraju kao odgovor na različite patološke procese kao što su infekcije, upalne bolesti, ishemije i traumatske ozljede (Lue i sur., 1999). Tijekom te aktivacije glija stanice luče TNF- α (Feuerstein i sur., 1994). Senilni plakovi u mozgovima bolesnika s AB povezani su s reaktivnim astrocitima i aktiviranim mikroglija stanicama koje potječu lučenje upalnih citokina kao što je TNF- α (Cacquevel i sur., 2004). Većina kroničnih neurodegenerativnih bolesti, uključujući AB, popraćena je upalnim odgovorom, posredovanim citokinima, nazvanim neuroupala ili neuroinflamacija. Iako je većina citokina, uključujući TNF- α , izražena na vrlo niskim razinama, u zdravom mozgu neuroupala povezana s bolesti može se otkriti godinama prije nego što dođe do apoptoze neurona u značajnom broju. U bolesnika s AB, aktivirane stanice mikroglija, posebice one povezane s amiloidnim naslagama, izlučuju visoke razine TNF- α (Lue i sur., 2001). Čini se da povišena razina TNF- α korelira s progresijom bolesti. Visoke razine TNF- α prisutne su u serumu bolesnika s teškom AB u odnosu na pojedince s blagom do umjerenom bolešću (Decourt i sur., 2017). Početni događaj u djelovanju TNF- α je njegovo vezanje na specifične receptore na staničnim površinama (Cheng i sur., 2010).

1.9.2. Protuupalni citokini

Protuupalni citokini su serija imunoregulatornih molekula koje kontroliraju proupalni citokinski odgovor (Sultani i sur., 2012). Njihova fiziološka uloga u upali i patološka uloga u

sustavnim upalnim stanjima sve više se prepoznaje. U ovu grupu ubrajaju se citokini koji kontroliraju proupalne citokinske reakcije (IL-3, IL-4, IL-10, TGF- β).

1.9.2.1 Interleukin 10

Među svim protuupalnim citokinima, IL-10 je citokin s jakim protuupalnim svojstvima potiskujući ekspresiju upalnih citokina kao što su TNF- α , IL-6 i IL-1 (de Vaal i sur., 1991). Ima važnu ulogu u potiskivanju imunološke reakcije i uključen je u procese održavanja imunološkog odgovora. Aktiviranjem limfocita Th1, monocita i NK stanica inhibira aktivaciju sinteze citokina uključujući IL-1, TNF- α , IL-6 i IL-8 (de Vaal i sur., 1991). Nedavne kliničke studije su pokazale da su niske koncentracije IL-10 u krvi pronađene u bolesnika s kroničnom boli (Uceyler i sur., 2006).

Primjena estrogena u post-menopauzi može odgoditi početak ili doprinijeti prevenciji AB putem povećanja izlučivanja IL-10 iz mikroglija stanica (Henderson i sur., 2006). Studije o povezanosti AB i upalnih biomarkera pokazale su kontroverzne rezultate. IL-10, protuupalni mediator, istaknut je kao jedan od glavnih citokina povezanih s pojavom AB, jer se smatra da tretman koji povećava razinu IL-10 može biti potencijalna terapija za AB, budući da ovaj citokin djeluje na smanjenje amiloidnih i protuupalnih molekula (Magalhães i sur., 2017). Nadalje, IL-10 može biti potencijalna terapija za AB jer potiče proizvodnju protuupalnih molekula i inhibiciju proupalnih citokina (Bagyinszky i sur., 2014). Protuupalna terapija nije dokazana kao vrijedna u liječenju AB i upalnih promijena, nakon što bolesnik ima određeni stupanj upale (Bryson i sur., 2016). Ističući neravnotežu proupalnog i protuupalnog djelovanja u AB, Zheng i suradnici naglašavaju važnost uloge citokina ili neuroupale u etiologiji i patogenezi AB (Zheng i sur., 2016). Ista studija i meta-analiza ne upućuje na značajne razlike u razinama IL-10 između ispitanika s MCI i zdravih kontrola. Upravo stoga se ističe da povezanost IL-10 s AB zahtijeva daljnja istraživanja temeljena na genetskim polimorfizmima, kao i na promijenljivoj razini ovog citokina u bolesnika s AB (Zheng i sur., 2016).

1.9.3. Koncentracija citokina u perifernoj krvi kod bolesnika s MCI i AB

Pregledom studija o citokinima povezanih s upalom u plazmi i serumu bolesnika s AB i MCI izdvojeno je 118 članaka objavljenih između 1989. i 2013. godine (Brosseron i sur., 2014). Nekoliko citokina kao što su TNF- α i IL-6, koji su promijenjeni u upalnim procesima povezanim s neurodegenerativnim poremećajima, pokazuju postojano povećanje, ali nedovoljno da bi se mogli koristiti kao pouzdani biomarkeri, dok drugi citokini ne pokazuju

promjene u krvi tijekom progresije bolesti. Povećane koncentracije TNF- α najčešće su pronađene u bolesnika s teškim oblikom AB i moguće je da se koncentracije ovog citokina lagano, ali kontinuirano povećavaju tijekom bolesti. Neki citokini (TNF- α , IL-6) mogu se stalno povećavati tijekom progresije bolesti ili privremeno tijekom napredovanja MCI u AB (Bermejo i sur. 2008). Moguće je da povišene koncentracije proupalnih citokina u perifernoj krvi mogu biti u korelaciji s povećanim rizikom pretvorbe MCI u AB. Međutim, rezultati ove meta-analize su proturječni i u cilju prevladavanja odstupanja potreban je visok stupanj metodičke standardizacije i kolektivne karakterizacije bolesnika uz stalna longitudinalna istraživanja tijekom duljeg niza godina (Brosseron i sur., 2014). TNF- α je najčešće istraživani citokin. Međutim rezultati studija o povezanosti TNF- α i AB su proturječni, te u 13 članaka postoje rezultati o promijenjenoj koncentraciji, koji pokazuju povišenu, smanjenu ili nepromijenjenu koncentraciju TNF- α u AB u odnosu na vrijednosti u kontrolnoj skupini (Brosseron i sur., 2014). Identificirano je 18 proteina plazme među kojima su IL-1 α i TNF- α , i takav multi-panel može razlikovati AB od kontrolne skupine s 90 % točnosti (Ray i sur., 2007). Ista je studija pokazala da se mogu identificirati MCI pacijenti koji su bili u opasnosti od progresije u AB (Ray i sur., 2007). Od 16 signalnih proteinskih molekula, među kojima su TNF- α i IL-1 α , ANG-2 (engl. *Angiopoietin-2*), EGF (engl. *Epidermal growth factor*), G-CSF (engl. *Granulocyte-colony stimulating factor*), GDNF (engl. *Glial cell-derived neurotrophic factor*), ICAM-1 (engl. *Intercellular adhesion molecule 1*), IL-1 α , IL-3, IL-8, IL-11, MCP-3 (engl. *Monocyte chemotactic protein-3*), M-CSF (engl. *Macrophage Colony Stimulating Factor*), MIP1 δ (engl. *Macrophage inflammatory protein 1*), MIP4 (engl. *macrophage inflammatory protein-4*), PDGF-BB (engl. *Platelet-derived growth factor*), RANTES (engl. *Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted*) 5 molekula je pokazalo povećanu koncentraciju kod bolesnika s MCI i AB u usporedbi sa zdravim ispitanicima – EGF, GDNF i MIP1 δ u AB, MIP4 u MCI i Rantes u MCI i AB (Marksteiner i sur., 2011). Koncentracije serumskog TNF- α nisu pokazale značajne razlike između skupina ispitanika koje su uključile bolesnike s AB usklađene prema dobi, spolu i težini demencije, bolesnike s vaskularnom demencijom i kontrolnu skupinu (Yasutake i sur., 2006).

Kod 124 bolesnice s AB potvrđen je trend povećanja vrijednosti koncentracija TNF- α i IL-10 u perifernoj krvi u odnosu na kontrolnu zdravu skupinu, ali te razlike nisu bile značajne (Baranowska i sur., 2008). Također nije utvrđena korelacija između A β u krvi i ispitivanih citokina u plazmi bolesnika s MCI i AB u odnosu na kontrolnu skupinu (Baranowska i sur., 2008). U istraživanju koje je provedeno s ciljem da se utvrdi mogu li povišene koncentracije

citokina predvidjeti prijelaz MCI u AB, nakon praćenja bolesnika nisu pronađene značajne razlike u koncentracijama TNF- α između bolesnika koji su razvili AB i bolesnika koji su zadržali dijagnozu MCI (Diniz i sur., 2010). Koncentracije serumskog TNF- α bile su značajno smanjene u bolesnika s AB, što autori objašnjavaju endogenom imunološkom disregulacijom (Cacabelos i sur., 1994). Slična studija o procjeni biokemijskih markera u bolesnika s AB i MCI pokazala je sličnost u koncentracijama TNF- α kod bolesnika s AB i MCI u odnosu na kontrolnu skupinu (Bermejo i sur., 2008). Nadalje, istraživanje o imunološkim markerima ispitivanih u bolesnika s različitim stupnjevima kognitivnih poremećaja (blagog, umjerenog i teškog) i kontrolnoj skupini bez demencije pokazali su značajno povećanje koncentracije TNF- α u bolesnika s teškim stadijem demencije u usporedbi s kontrolnom skupinom (Bonotis i sur. 2008), no koncentracije IL-1 α i IL-10 nisu se značajno razlikovale između tih ispitanika (Bonotis i sur. 2008). Kod istraživanja povezanosti upalnih proteina u perifernoj krvi s ozbiljnošću AB utvrđeno je da je IL-10 bio povezan s kliničkim dokazima o ozbiljnosti bolesti te se predlaže kao biomarker progresije bolesti (Leung i sur., 2013). Istraživanje provedeno u Južnoj Koreji na populaciji starijoj od 65 godina i praćeno u razdoblju od 2,4 godine gdje su ispitanicima izmjerene koncentracije IL-1 α i TNF- α na početku i u tijeku praćenja, pokazalo je značajnu povezanost između koncentracije citokina i demencije (Kim i sur., 2018). Autori su naglasili da demencija može prethoditi promjenama u koncentraciji serumskih citokina i upali, a ne da su promjene citokina posljedice demencije (Kim i sur., 2018). Općenito, djelovanje citokina je rezultat složenih i kompleksnih interakcija, koje često uključuju povratne petlje i komplicirane kaskade, a ukupan odgovor ovisi o sinergističkim ili antagonističkim djelovanjima njegovih različitih komponenti (Zhang i sur., 2007). To je rezultat njihovog pleiotropnog djelovanja i teško je odrediti specifične uloge pojedinačnih citokina. Kiyota i suradnici (2012) su pokazali da IL-10 značajno smanjuje neuroupalu, poboljšava neurogenezu i poboljšava prostornu kognitivnu disfunkciju u transgeničnim AB mišjim modelima. Pokazali su da liječenje IL-10-adenovirusom pridruženim virusom dvostrukih transgenih miševa koji ekspimiraju porodične mutacije AB amiloidnog prekursora proteina + presenilin-1 (APP + PS1 Tg) može suzbiti astrogliozu i mikrogliozu (Kiyota i sur., 2012). Ti nalazi podržavaju koncept da IL-10 ima terapijski potencijal za ublažavanje neuroinflammacije, kognitivne disfunkcije i neurodegeneracije (Kiyota i sur., 2012). Neravnoteža između proupalnih i protuupalnih citokina može, stoga, biti važan fenomen kod AB. Ovu hipotezu potkrepljuju studije koje su opisale porast od sedam do deset puta u proizvodnji IL-1 β iznad razine IL-10 kod bolesnika s AB u usporedbi s kontrolnim ispitanicima (Ma i sur., 2005). Rota i sur. nisu otkrili abnormalne razine IL-10 u cerebrospinalnoj tekućini ili u serumu bolesnika s AB (Rota i sur., 2006).

1.9.4. Genetički polimorfizmi citokina

Polimorfizmi u genima koji reguliraju citokine, povezani s upalom, upućuju na povezanost neuroupalnih čimbenika i rizika AB (Su i sur., 2016). AB je neurodegenerativno oboljenje s nasljednom komponentom (Bertram i Tanzi, 2005). Kontradiktorni rezultati brojnih istraživanja koja nalaze povezanost između rizika AB i genetskih polimorfizama upalnih citokina, u prvom redu IL-1, IL-4, IL-6, IL-10 i TNF- α , pokazuju neujednačenost i ne daju odgovor koji genotipovi su rizični, a koji protektivni u razvoju AB (Su i sur., 2016).

1.9.4.1 Polimorfizam IL-1 α rs1800587

IL-1 ima dva strukturno različita oblika, IL-1 α i IL-1 β . IL-1 gen je dio skupine koji su smješteni na dugom kraku kromosoma 2 (2q14-21) koji uključuju IL-1 α , IL-1 β i IL-1RN gene koji kodiraju IL-1 α , IL-1 β , IL-1 receptorski antagonist citokina (IL-1Ra) i dva IL-1 receptora (Dinarello i sur., 1996). U oba gena poznati su polimorfizmi koji imaju funkcionalno značenje. Polimorfizmi IL-1 povezani su s upalnim stanjima. Ovaj skup sadrži nekoliko polimorfizama koji su povezani s imunološkim bolestima kao što su reumatoidni artritis, miastenija gravis i multipla skleroza (Dinarello 2018).

Povezanost polimorfizma IL-1 α -889 C/T ili rs1800587 i AB testirana je u različitim studijama, ali rezultati i dalje nisu ujednačeni (Li i sur., 2013). Utvrđena je značajna razlika u aktivnosti mikroglia u bolesnika s AB koji su nosioci T alela IL-1 α rs1800587 i onih s IL-1 α TT genotipom u odnosu na pacijente bez alela T obzirom na IL-1 α rs1800587 (Hayes i sur., 2004). Postmortalni nalazi studije na 232 bolesnika s kliničkom poviješću demencije iz 4 velika centra, Little Rock (SAD), Glasgow, Bristol, Oxford (UK), upućuju da polimorfizam IL-1 α rs1800587 snažno povećava rizik za AB (Nicoll i sur., 2000). Postmortalni nalazi studije provedene u UK na 68 bolesnika s AB pokazuju da genetske varijacije proupalnih gena IL-1 α , IL-1 β i APOE4 utječu na stupanj upale u mozgu bolesnika s AB (Gomez-Nikola i Boche, 2015). Aktivacija mikroglia stanica veća je u frontalnom korteksu bolesnika s AB koji nose T-alel IL-1 α rs1800587, posebno u onih koji su nosioci TT genotipa, a ti se učinci povećavaju kada je prisutan i rizični alel APOE4 (Safieh i sur., 2019). Polimorfizmi unutar gena IL-1 α utječu na stupanj aktivacije moždanih mikroglialnih stanica, posebno u nosioca alela APOE4, pojačavajući važnost i neuroupalne procese u patogenezi AB (Hayes i sur., 2004).

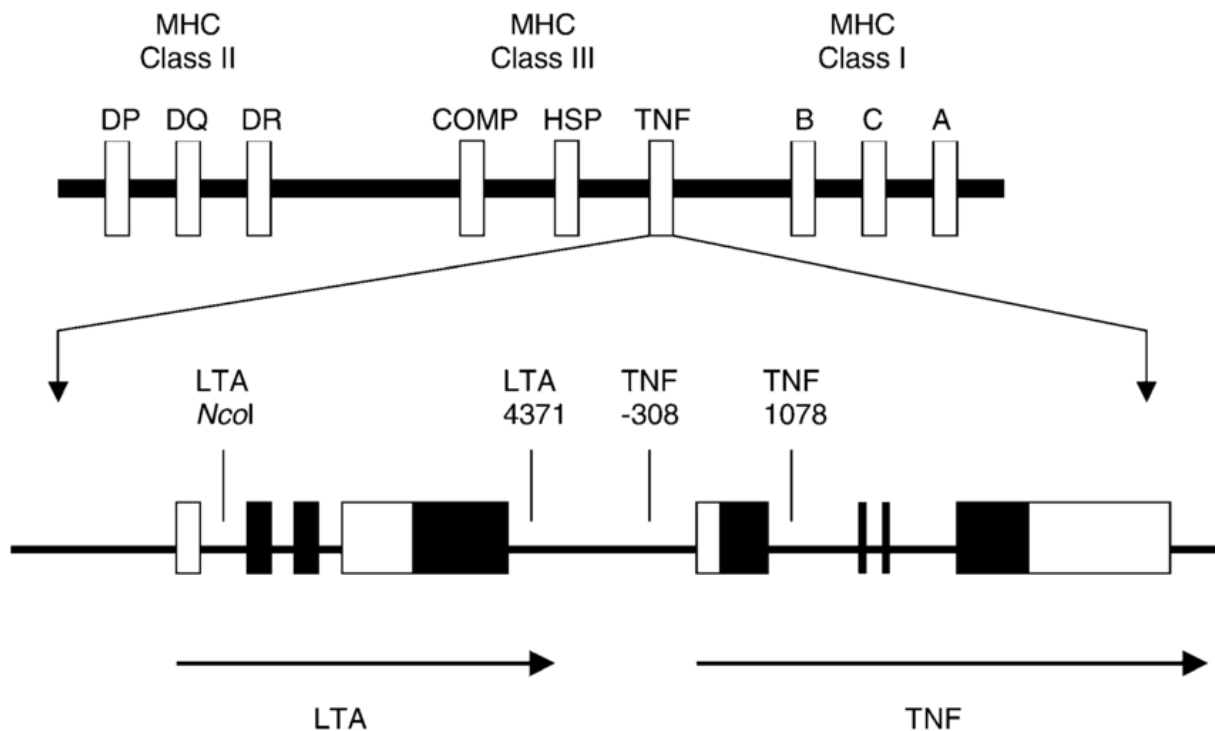
Nasuprot tome, istraživanje provedeno u Turskoj, na 95 bolesnika s kliničkim znacima AB, nije pokazalo povezanost između IL-1 α rs1800587 i AB (Yildiz i sur., 2015). Slično zajedničko

istraživanje provedeno u Italiji i Grčkoj upućuje na nedostatak povezanosti između polimorfizma IL-1 α rs1800587 i AB u dva neovisna europska uzorka (Seretti i sur., 2009). Istraživanje provedeno na 110 bolesnika sa sporadičnim oblikom AB i 130 nepsihijatrijskih kontrola nisu pokazala povezanost između varijanti IL-1 α rs1800587 i AB, osim što su heterozigoti CT imali izraženu jaču depresiju u usporedbi s osobama nosiocima TT ili CC genotipova obzirom na IL-1 α rs1800587 (Seretti i sur., 2009).

Dvije meta-analize provedene 2012. godine utvrdile su povezanost polimorfizma IL-1 α rs1800587 i AB u pripadnika bijele, ali ne i žute rase (Su i sur., 2016). U meta-analizi temeljenoj na 32 studije Qin i suradnici ističu da nije neuobičajeno da isti polimorfizam može imati različitu ulogu u bolesti među različitim etničkim populacijama jer je AB komplicirana multi-genetska bolest i različita genetska podloga može pridonijeti nepodudarnosti među studijama (Qin i sur., 2012). U drugoj meta-analizi Hua i suradnika ističe se da nije postignut jasan konsenzus o povezanosti polimorfizma IL-1 α rs1800587 i rizika za razvoj AB, iako rezultati navedene meta-analize pokazuju da pojedinci nosioci T alela obzirom na IL-1 α rs1800587 imaju skoro 9 % veći rizik za razvoj AB u odnosu na pacijente koji nisu nosioci alela T (Hua i sur., 2012).

1.9.4.2 Polimorfizam TNF- α (rs1800629)

Kodirajući gen za čimbenik nekroze tumora alfa (TNF- α) smješten je na kratkom kraku kromosoma 6. Većina polimorfizama gena TNF- α smještena je u njegovoj promotorskoj regiji i smatra se da imaju ulogu u patogenezi nekoliko bolesti (Zhang i sur., 2013).

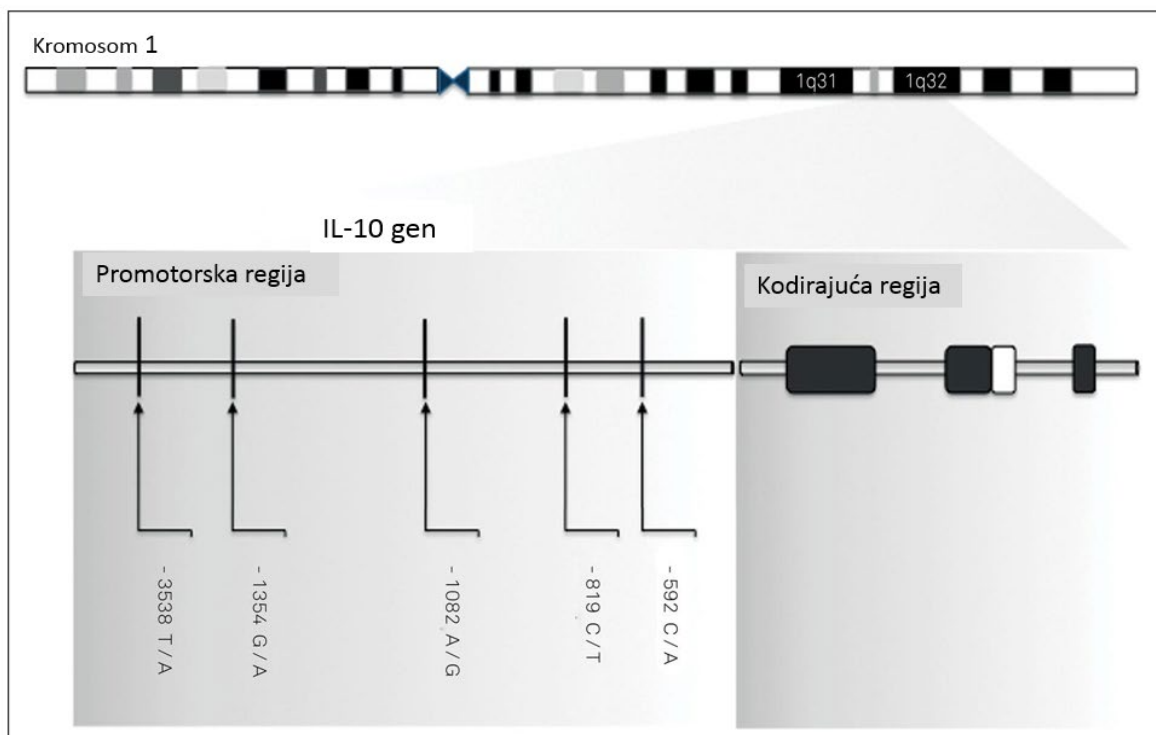


Slika 1.10. Shematski prikaz gena TNF- α na kromosomu 6, (Preuzeto: https://www.researchgate.net/figure/Top-Schematic-representation-of-the-TNF-genes-on-chromosome-6-in-relation-to-other_fig1_7768096)

Za polimorfizme u promotorskoj regiji TNF- α navodi se da povećavaju brzinu transkripcije gena i tako mogu utjecati na rizik za AB (Tedd i sur., 2008). Među njima je polimorfizam smješten na TNF- 308 bp. Pokazalo se da je polimorfizam TNF- α -308 G/A ili rs1800629 povezan s povećanom transkripcijskom aktivnošću gena (Fargion i sur., 2002). Rezultati meta-analize upućuju da polimorfizam TNF- α rs1800629 može biti povezan s povećanim rizikom od AB u kineskoj populaciji i smanjenim rizikom od AB u sjevernim europskim populacijama (Švedska, Njemačka i Finska) (Wang, 2015). Meta-analiza koja je obuhvatila ukupno 16 studija koje su uključivale 3826 bolesnika s AB i 4327 kontrolnih ispitanika, nije pokazala povezanost između A alela TNF- α rs1800629 i AB kada su svi ispitanici uzeti u obzir (Lee i sur., 2015). Međutim nakon analize prema etničkoj pripadnosti, meta-analiza je pokazala da je alel A obzirom na TNF- α rs1800629 značajno povezan s AB u istočnoazijskoj populaciji. Ova meta-analiza pokazuje da TNF- α rs1800629 polimorfizam može predstavljati značajan čimbenik rizika za AB u istočnoazijskoj populaciji, ali ne i u europskoj ili srednjoistočnoj populaciji (Lee i sur., 2015).

1.9.4.3 Polimorfizam IL-10 (rs1800896)

Interleukin-10 kodiran je genom smještenim na dugom kraku kromosoma 1 između položaja 31 i 32 (Culpan i sur., 2006). Regulatorne regije gena IL-10 povezane su s kroničnim upalnim bolestima, kao što su sistemski eritematozni lupus, reumatoidni artritis, Sjögrenov sindrom, kao i razvoj demencije (Depboylu i sur., 2003). Veći broj polimorfizama povezani su s ekspresijom gena IL-10, a neki od njih su prikazani u Slici 1.11.



Slika 1.11. Kromosom 1, IL-10 gen i SNP u promotorskoj regiji. (Preuzeto i prilagođeno: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-282X2017000900649)

Nekoliko jednostavnih zamjena baza ili SNP-ova u regulatornom području IL-10 su povezani s modulacijom proizvodnje IL-10 (Liu i sur., 2016). To može rezultirati neravnotežom regulatornog učinka IL-10 na proupalne citokine s naknadnom neravnotežom imunološkog odgovora (Lio i sur., 2003). IL-10 ima zaštitnu ulogu u SŽS-u. Njegova uloga je protuupalna, anti-apoptotska i on potiče stanično preživljavanje (Strle i sur., 2001). Genetske studije pokazale su da su samo neki polimorfizmi u promotorskoj regiji povezani s rizikom za razvoj AB (Xiao i sur., 2017). Rezultati niza studija provedenih u cilju istraživanja povezanosti protuupalnog citokina IL-10 i patogeneze AB nisu ujednačeni (Di Bona i sur., 2012).

Studija provedena na meksičkoj populaciji pronašla je značajnu povezanost između polimorfizama IL-10 i rizika od demencije. Nadalje, rezultati ove analize genotipova, alelne distribucije i haplotipova IL-10 polimorfizama -1082A/G (rs1800896) i -819T/C (rs1800871) i -592A/C (rs1800872) upućuju na moguću povezanost haplotipova ATA, CTG i CTA obzirom na rs1800896, rs1800871 i rs1800872 i povećanog uzroka osjetljivosti na AB. Identificirana su dva haplotipa rizika ATA i CTA i četiri zaštitna haplotipa ATG, CTG, ACG što se objašnjava genetskom raznolikošću među stanovništvom (Vargas i sur., 2016).

Podatci meta-analize gdje je analizirano petnaest studija koje su istraživale povezanost polimorfizama IL-10 (rs1800896, rs1800871 i rs1800872) i AB upućuju na značajnu povezanost između IL-10 rs1800896 polimorfizma i rizika od AB (GG prema nosiocima A) i taj rizik je izraženiji kod najstarijih bolesnika. Ista studija je pokazala da je haplotip GCC obzirom na rs1800896, rs1800871 i rs1800872 povezan s manjim rizikom od AB (Di Bona i sur., 2012). Podatci istraživanja na ispitanicima iz Španjolske provedeni na 231 bolesniku s AB i 194 zdrave kontrole su pokazali da bi estrogen mogao zaštititi mozak od neurodegeneracije povećanjem sekrecije protuupalnog IL-10 iz mikroglijnih stanica. Rezultati upućuju da su ispitanici koji su nosioci gena koji kodiraju aromatazu (kritični enzim u perifernoj sintezi estrogena) 5-UTR GG i IL-10 rs1800896 GG genotipove imali šest puta manji rizik od razvoja AB u odnosu na ispitanike bez tih genotipova (Combarros i sur., 2008). Lio i suradnici istraživali su ulogu polimorfizma IL-10 u skupini ispitanika iz Sjeverne Italije, 132 bolesnika s AB i 213 zdravih kontrolnih ispitanika, gdje su ispitali prevalenciju rs1800896, rs1800871 i rs1800872 u IL-10 promotorskoj regiji. Postotak bolesnika koji su bili nositelji A alela IL-10 rs1800896 bio je značajno veći među oboljelima od AB u odnosu na kontrolnu skupinu. Autori zaključuju da se prisutnost A alela IL-10 rs1800896, a posebno haplotipa ATA obzirom na rs1800896, rs1800871 i rs1800872, može povezati s niskom proizvodnjom protuupalnog citokina IL-10, što se može smatrati i neovisnim čimbenikom genetskog rizika za AB (Lio i sur., 2003). Istraženi su polimorfizmi IL-10 rs1800896, rs1800871 i rs1800872 kod 406 bolesnika s AB i 251 zdravih kontrolnih ispitanika iz Njemačke (Depboyl i sur., 2003). Nisu pronađene značajne razlike u raspodjeli genotipova ili alela ovih polimorfizama između bolesnika s AB i kontrolnih ispitanika (Depboyl i sur., 2003). Pretpostavlja se da IL-10 može utjecati na konverziju MCI u AB ili biti genetski marker osjetljivosti. Nakon četverogodišnjeg razdoblja praćenja, dvadeset i četiri bolesnika s MCI koji su napredovali u AB bili su nosioci AA genotipa obzirom na IL-10 rs1800896 (41,7 %) u odnosu na one koji su ostali stabilni (28,6 %) i u usporedbi s onima koji su napredovali u vaskularnu demenciju (27,3 %) (Arosio i

sur., 2010). Drugo istraživanje koje je uključivalo talijansku populaciju istraživalo je učestalost alela i distribuciju polimorfizama IL-10 rs1800896 i rs1800871 kod 222 bolesnika sa sporadičnim oblikom AB i 179 kontrolnih ispitanika. Otkriveno je da je haplotip AT značajno povezan s povećanim rizikom za razvoj AB (Bagnoli i sur., 2007). Ma i suradnici istraživali su tri SNP-a, rs1800896, rs1800871 i rs1800872 u 95 bolesnika s AB i 117 zdravih kineskih ispitanika koji su bili dobno usklađeni. Otkrili su snažnu povezanost između AB i dva polimorfizma IL-10 rs1800871 i rs1800872. Smanjena ekspresija IL-10 povezana je s C alelima kod IL-10 rs1800871 i rs1800872, a autori su zaključili da funkcionalni polimorfizmi gena IL-10 djeluju kao čimbenik rizika za AB (Ma i sur., 2005). U studiji na američkoj bijeloj populaciji (265 starijih bijelih bolesnika s AB i 347 kontrolnih ispitanika) istražen je mogući utjecaj polimorfizama promotorske regije na genu IL-10 i rizika od AB. Nije utvrđena razlika za frekvencije alela i genotipa IL-10 rs1800896 i rs1800872 između skupina (Ramos i sur., 2006). Istraživanje na turskoj populaciji polimorfizama gena TNF- α rs1800629, IL-6 -174 rs1800795 i IL-10 rs1800896 kao čimbenika osjetljivosti na AB u 101 bolesnika sa sporadičnim oblikom AB i 138 zdravih ispitanika, zaključuje da su heterozigoti (AG) ili nosioci alela A (AG + AA genotip) IL-10 rs1800896 bili povezani s približno dvostrukim povećanjem rizika od AB u odnosu na polimorfizme TNF- α rs1800629, IL-6 rs1800795 (Vural i sur., 2009).

Meta-analiza o povezanosti između polimorfizma IL-10 rs1800896 i rizika od razvoja AB (2158 bolesnika i 2088 kontrolnih ispitanika u 12 studija) pokazala je da su nosioci alela A (AA + AG) imali 27 % povećani rizik za razvoj AB, u usporedbi s GG homozigotima (Di Bona i sur., 2012). U analizi etničkih skupina, značajan povišen rizik povezan je s prisustvom alela A u Europljana, ali ne i u Azijata, što upućuje na genetsku raznolikost među etničkim skupinama (Zhang i sur., 2011). Meta-analiza autora koja je istraživala povezanost uobičajenih polimorfizama IL-10 rs1800896, rs1800871 i rs1800872 s rizikom za razvoj AB, gdje je analizirano petnaest studija, ističe povezanost između A alela rs1800896 i rizika od AB. Nije pronađena povezanost između AB i polimorfizama rs1800871 i rs1800872 (Di Bona i sur., 2012).

Istražena je raspodjela polimorfizama IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 β , IL-18, TGF- β 1, TLR-4 i TNF- α gena u brazilskoj populaciji (120 bolesnika s AB i 412 zdravih ispitanika) iz srednjeg zapadnog Brazila. Samo su polimorfizmi IL-10 rs1800896 i IL-6 rs1800795 u recesivnim i dominantnim modelima, pokazali značajan učinak na predispoziciju za razvoj AB. Ti su nalazi pokazali gotovo 40 % manju šansu za razvoj AB među osobama koje su bile nosioci

homozigotnog AA genotipa IL-10 rs1800896 (Moraes i sur., 2013). Kang i suradnici su istraživali uključenost polimorfizama šest proupalnih (IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α) i dva protuupalna (IL-4 i IL-10 rs1800896) gena za citokine, koji su mogli biti povezani s većom proizvodnjom proupalnih i nižom proizvodnjom protuupalnih citokina kod 732 starije korejske osobe s AB ili depresijom. Pronašli su da su polimorfizmi TNF- α rs1800629 i IL-8 rs4073 značajno povezani s AB, a IL-1 β rs1143634 s depresijom u kasnom životu (Kang i sur., 2015). Meta-analiza je istražila povezanost između polimorfizma rs1800587 IL-1 α , rs16944 IL-1 β , rs1800795 IL-6 i rs1800896 IL-10 i rizika od AB (Mun i sur., 2016). Ti rezultati upućuju da polimorfizam IL-1 α rs1800587 može biti potencijalni čimbenik rizika za razvoj AB. Međutim, ostala tri polimorfizma, uključujući polimorfizam IL-10 rs1800896, nisu potvrđeni kao čimbenici rizika za AB (Mun i sur., 2016). Istražena je učestalost TNF- α rs1800629, TGF- β 1 rs1982073, TGF- β 1 rs1800471, interleukin IL-10 rs1800896, IL-10 rs1800871, IL-10 rs1800872, IL-6 rs1800795 i IFN- γ rs2430561 u uzorku starijih bolesnika, kako bi se provjerila povezanost između ovih SNP-a i kognitivnih i funkcionalnih izvedbi pojedinaca u dobi od 75 godina ili više. U ovom istraživanju bilo je uključeno 259 sudionika u Brazilu, 135 s oštećenjem kognitivnih sposobnosti (81 s oštećenjem kognitivnih funkcija bez demencije i 54 dementirane starije osobe) i 124 kognitivno zdrave kontrole podudarne dobi i spola. Nosioi G alela rs1800896 imali su i bolje rezultate u kratkim kognitivnim testovima probira. Nosioi alela -819T i alela -592A pokazali su lošije odgovore od nosioca drugih genotipova u istim testovima. Haplotip GTA obzirom na rs1800896, rs1800871 i rs1800872 koji je povezan s nižom ekspresijom IL-10, bio je češći u skupini bolesnika s demencijom (Fraga i sur. 2017).

Studije o povezanosti AB i polimorfizama vezanih za IL-10 pokazale su kontroverzne rezultate. Određene kombinacije genetskih varijanti u regulatornim regijama dvaju gena, tj. IL-6 rs1800795 i IL-10 rs1800896 doprinose kroničnoj upali u starijih osoba, povećavajući rizik od AB (Combarros i sur., 2009). Odstupanja između studija mogu se objasniti nekontroliranim zbunjujućim čimbenicima, interakcijom gena i gena ili činjenicom da su neki polimorfizmi prisutni s različitim alelnim frekvencijama u određenim populacijama, jer je utvrđeno da je raspodjela IL-10 polimorfizama različita u bijeloj i azijskoj populaciji (Ma i sur., 2005). Tablica 1.8. pokazuje raznolikost literaturnih nalaza o povezanosti i nedostatku povezanosti genetskih varijanti IL-10 i AB.

Tablica 1.8. Povezanost polimorfizama IL-10 i Alzheimerove bolesti u različitim studijama.

Autori	Lokacija	Ispitanici (Grupe)	IL-10 polimorfizmi	Zaključak
Depboylu i sur., 2003	Njemačka	AB: 406 Kontrolna skupina: 251	-1087A/G -824C/T -597C/A	Nisu utvrđene značajne razlike između bolesnika sa AB i kontrolne skupine.
Lio i sur., 2003	Italija	AB: 132 Kontrolna skupina: 213	-1082A/G -819C/T -592C/A	Prisutnost alela -1082A povezano s niskom produkcijom IL-10, može se smatrati neovisnim genetskim čimbenikom rizika za AB.
Scassellati i sur., 2004	Italija	AB: 215 Kontrolna skupina: 153	-1082G/A -819C/T -592C/A	Frekvencije haplotipa nisu otkrile razlike. Međutim, genotip GCC / ACC bio je češći u AB.
Arosio i sur., 2004	Italija	AB: 65 Kontrolna skupina: 65	-1082A/G -819C/T -592C/A	Kod AB je značajan porast alela -1082A i smanjena frekvencija genotipa -1082GG.
Ma i sur., 2005	Kina	AB: 95 Kontrolna skupina: 117	-1082A/G -819C/T -592C/A	Smanjena ekspresija IL-10 bila je povezana s alelima -819C i -592C.
Culpan i sur., 2006	Engleska	AB: 160 Kontrolna skupina: 92	-3538T/A/-1354G/A -1082A/G/-819C/T -592C/A	Nijedan SNP nije povezan s AB
Ramos i sur., 2006	Amerika	AB: 265 Kontrolna skupina: 347	-1082A/G -592C/A	Nije uočena razlika između bolesnika sa AB i kontrolne skupine.
Bagnoli i sur., 2007	Italija	AB: 222 Kontrolna skupina: 179	-1082A/G -819C/T	Haplotip -1082A / -819T povezan je s povećanjem rizika od razvoja AB.
Vural i sur., 2009	Turska	AB: 101 Kontrolna skupina: 138	-1082A/G	Heterozigoti (AG) ili A alelni nosioci (AG + AA genotip) bili su povezani s približno dvostrukim povećanjem rizika od AB.
Combarros i sur., 2009	Engleska, Španjolska, Nizozemska i Njemačka	AB: 1. 757 Kontrolna skupina: 6. 295	-1082A/G	Disregulacija gena IL-10 doprinosi kroničnoj i upali kod nekih starijih ljudi i povećava rizik od AB.
Arosio i sur., 2010	Italija	MCI: 138 AB:63 Kontrolna skupina: 63	-1082A/G	Učestalost alela ovog SNP-a kod osoba s MCI bila je slična frekvenciji bolesnika s AB-om, dok su frekvencije mcd-MCI usporedive s kontrolnom skupinom.
Ribizzi i sur., 2010	Kavkaska populacija	AB: 19 Kontrolna skupina: 20	-1082A/G -819C/T	Alel -819C je izražen u AB grupi i povezan je s niskom produkcijom IL-10.
Moraes i sur., 2013	Brazil	AB: 120 Kontrolna skupina: 412	-1082A/G	SNP -1082A / G pokazao je učinak predispozicije za početak AB. Gotovo 40% manja vjerojatnost AB kod homozigota alela IL10 -1082A.
Kang i sur., 2015	Koreja	AB: 86 Nema AB: 625	-1082A/G	Ne postoji značajna povezanost između bolesnika s AB i ispitanika koji su bez AB.
Vargas-Alarcón i sur., 2016	Meksiko	AB: 122	-1082A/G	Identificirana su dva haplotipa rizika (ATA i CTA) i četiri zaštitna haplotipa (ATG, CTG, ACG i CCG).
		Vaskularna demencija: 67	-819C/T	
		Miješana demencija: 32		
		Kontrolna skupina: 986		
Fraga i sur., 2016	Brazil	Kognitivni poremećaj: 135	-1082A/G	Haplotip -1082 / -819 / -592, povezan s nižom ekspresijom IL-10, bio je češći u skupini bolesnika.
		Kontrolna skupina: 124	-819C/T	
			-592C/A	

AB – Alzheimerova bolest, MCI – blagi kognitivni poremećaj (engl. Mild cognitive impairment), mcd-MCI – višestruko oštećene kognitivne domene (engl. multiple cognitive domain); (Preuzeto i prilagođeno: Magalhaes C.A., Carvalho M.D.G., Sousa L.P., Caramelli P., Gomes K.B. Alzheimer's disease and cytokine IL-10 gene polymorphisms: Is there an association? Arq. Neuropsiquiatr. 2017;75:649-656)

1.9.4.4 Povezanost koncentracije IL-1 α , TNF- α i IL-10 i polimorfizama IL-1 α rs1800587, TNF- α rs1800629 i IL-10 rs1800896

Citokini su privukli pažnju istraživača radi uloga u razvoju različitih faza AB i eventualnim mogućnostima ciljane terapije. Međutim, razina citokina otkrivena u bolesnika s AB nije konzistentna među različitim studijama i različitim istraživačkim skupinama, dok je reguliranje ekspresije citokina u animalnim modelima AB dalo i neočekivane rezultate (Zheng i sur., 2016). Kako se citokini brzo mijenjaju kao odgovor na infekcije ili traume, klasificirani su ili kao „proupalni” ili „protuupalni”. Ravnoteža između dvije vrste citokina jamči trenutno uklanjanje invazivnih patogena i pravodobno povlačenje prekomjerne reakcije, što je ključ za sprječavanje mnogih bolesti, uključujući neurodegenerativne bolesti. Ekspresija citokinskih receptora vremenski je i prostorno regulirana u SŽS-u (Szelényi, 2001), a oni su usko uključeni u staničnu proliferaciju, gliogenezu, neurogenezu, staničnu migraciju, apoptozu i sinaptičko oslobađanje neurotransmitera (Borsini i sur., 2015). Iako su mnoge studije raspravljale o promjenama razine citokina povezanih s njihovim odgovarajućim funkcionalnim polimorfizmima, podatci se uglavnom temelje na drugim područjima istraživanja, poput tumorskih bolesti. Izravni dokazi za koncentraciju citokina u različitim populacijama, među različitim istraživačkim skupinama, nisu dovoljno uvjerljivi da bi se mogli izvesti definitivni zaključci (Zheng i sur., 2016). Različiti citokini akumuliraju se oko amiloidnih plakova u mozgu bolesnika s AB, što je dovelo do brojnih studija koje su istraživale razinu proupalnih i protuupalnih citokina u serumu bolesnika s MCI ili AB. Iako rezultati nisu usaglašeni, pojavljuje se trend da su i proupalni i protuupalni citokini povišeni u serumu bolesnika s AB (Brosseron i sur., 2014).

Stoga su novi biomarkeri koji se temelje na pristupačnijim materijalima, poput plazme, privlačni, jer nude lako dostupne pokazatelje koji se mogu koristiti u poboljšanju dijagnoze AB. Nekoliko citokina mijenja se ovisno o fazi i napretku bolesti, što upućuje da citokini mogu poslužiti kao potencijalni prediktori bolesti (Wichmann i sur., 2014).

Tablica 1.9. Koncentracije citokina IL-1 α , TNF- α I IL-10 u serumu i utjecaj polimorfizma citokina

Citokini		Razine		Polimorfizam/ haplotivi	Rezultati	Metode	Reference
		MCI	AB				
		Plazma/Serum	Plazma/Serum				
Obitelj IL-1	IL-1 α	=	= ili ↓	-889 C / T (rs1800587)	* ↑ u EOAD-u	Meta-analiza	Li i sur. 2013.
					Nema * u LOAD		
					* ↑ kod bijele populacije	Meta-analiza	Dong i sur. 2016.
					Nema * kod Azijata		
IL-10		=	= ili ↑	-1082 A / G (rs1800896)	* ↑ kod bijelaca, nema * u Azijata	Meta-analiza	Zhang i sur. 2011.
					↓ u bijeloj populaciji	Meta-analiza	Di bona i sur. 2015.
TNF- α		= ili ↑	= ili ↑ ili ↓	-308 G / A (rs1800629)	* ↑ u istočnoazijskoj	Meta-analiza	Wang i sur. 2015.
					* ↓ u sjevernoj Europi		
					Nema * u Talijana	Slučaj	Flex i sur. 2014.

*Kratice: EOAD – AB s ranim početkom; LOAD – AB s kasnim početkom ili sporadični AB; * – značajno; ↑ – visok rizik od pojave AB; ↓ – smanjen rizik od pojave AB;*

(Preuzeto i prilagođeno: Zheng C, Zhou XW, Wang JZ. The dual roles of cytokines in Alzheimer's disease: update on interleukins, TNF- α , TGF- β and IFN- γ . Transl Neurodegener. 2016;5:7)

1.10. Utjecaj različitih varijabli na citokine u laboratorijskim istraživanjima

Unatoč činjenici da je preanalitička obrada najveći izvor varijabilnosti u laboratorijskim ispitivanjima, trenutno ne postoje standardizirane preanalitičke smjernice za laboratorijsko ispitivanje citokina. Trenutna međunarodna radna skupina daje početno polazište za takve smjernice za standardizirane operativne postupke (SOP). Očekuje se da će ove smjernice biti ažurirane kako budu dostupna dodatna otkrića (O'Bryant i sur., 2015). Tablica 1.10. prikazuje kontrolirane i nekontrolirane varijable koje mogu utjecati na rezultate istraživanja citokina u krvi ispitanika s AB.

Tablica 1.10. Kontrolirane i nekontrolirane varijable koje mogu utjecati na nalaz citokina u krvi u studijama AB

<u>Kontrolirane varijable</u>	<u>Nekontrolirane varijable</u>
Izbor spremnika (serum/plazma)	Demografske karakteristike (dob, spol, nacionalnost/rasa)
Vrijeme sakupljanja uzoraka	<i>ApoE ε4</i> (i drugi geni)
Status posta	Status pušenja
Veličina igle i mjesto uzorkovanja	Gestacija
Rukovanje spremnicima (npr. inverzije)	Dijeta
Vrsta spremnika i aditivi	Lijekovi
Redoslijed spremnika	Komorbidnosti koje nisu AB
Parametri centrifugiranja	Konzumiranje alkohola
Vrijeme od uzorkovanja do zamrzavanja	Razina aktivnosti
Temperatura smrzavanja	
Ciklusi zamrzavanja i odmrzavanja	
Veličina alikvota	

(Preuzeto i prilagođeno: Zheng i sur., 2016)

Nedosljednosti u rezultatima različitih studija mogu se pripisati mnogim preanalitičkim varijablama, tehničkim i biološkim varijablama u studijama koje mogu imati utjecaj na rezultate ispitivanja. Postoje mnogobrojni izvori pogrešaka tijekom studija (Lista i sur., 2013). Fiziološke varijable koje treba uzeti u obzir uključuju demografske podatke (dob, spol, rasa, nacionalnost), sveukupno zdravlje, hrana i piće konzumirana prije prikupljanja uzoraka, konzumiranje droga, alkohola, prehrambeni dodatci, pušenje, gestacija, prehrana, tjelovježba, kao i zdravstveno stanje pacijenta i uzimanje lijekova. To uključuje odabir sudionika studije, obzirom na njihovu etničku pripadnost i način života. Uz to treba paziti na snagu uzorka tj. na statistički izračunat dovoljan broj sudionika istraživanja (Rai i Vitzthum, 2006). Jedan od najvažnijih čimbenika je uzorak krvi koji se koristi za testiranje, a koji može biti serum ili plazma. Određeni analiti koji se određuje može varirati u različitim uzorcima, a aditivi koji se nalaze u spremnicima (epruvetama) kao što su heparin, natrijev citrat, etilendiamintetraoctena kiseline (EDTA) mogu

utjecati na stabilnost analita (Issaq i sur., 2007). Daljnji ključni korak u izbjegavanju pogrešaka je ispravno rukovanje uzorcima nakon uzorkovanja krvi. Tu je važno vrijeme od uzimanja krvi do pohrane krvi, temperature pohrane, centrifugiranje uzoraka i volumen alikvota. Smjernice CLSI, dokument H18-A4 (engl. *Clinical Laboratory Standards Institute*) upućuju da se ne bi trebali pohranjivati alikvoti koji su u kontaktu sa stanicama više od dva sata (Lima-Oliveira i sur., 2015). Brzina centrifugiranja bi trebala biti 2000g tijekom 10 minuta (Rai i sur., 2005). Stabilnost proteina i enzimska aktivnost ovise o temperaturi (Mischak i sur., 2007). Dugotrajna pohrana uzoraka treba biti na -80 °C ili u tekućem dušiku. Nadalje, pohrana u tekućem dušiku bi trebala osigurati stabilnost proteina (Rai i sur., 2005). Radna skupina za ispitivanje analita iz uzoraka krvi bolesnika s AB ističe potrebu za usvajanjem smjernica i standarda za predanalitičke metode obrade krvi u AB istraživanju (Henriksen i sur., 2014). Svrha pružanja trenutnih smjernica međunarodne radne skupine je započeti postupak i dijalog za kretanje prema standardiziranim metodama koje se mogu upotrijebiti za određivanje krvnih biomarkera koje će biti bliskije kliničkoj ili dodatnoj istraživačkoj praksi. Važan korak bit će detaljno otkrivanje predanalitičkih parametara koji se koriste za prikupljanje kliničkih uzoraka u publikacijama kliničke procjene biomarkera. U trenutnom dokumentu nalaze se informacije o minimalnim potrebnim informacijama o tim preanalitičkim metodama koje se koriste za olakšavanje unakrsne validacije metoda u istraživačkim timovima. Dodatni dokumenti radne skupine odnosit će se na analitičke i post-analitičke varijable (O'Bryant i sur., 2015).

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

2.1. Svrha istraživanja

Alzheimerova bolest je izrazito složena i vrlo učestala, teška neurodegenerativna bolest sa smrtonosnim ishodom, čija neurobiološka podloga nije još potpuno razjašnjena. Predloženo istraživanje doprinijet će boljim spoznajama o ulogama citokina u razvoju AB i ponuditi bolji uvid u povezanost koncentracije citokina IL-1 α , TNF- α i IL-10 u krvi, kao i povezanosti polimorfizama IL-1 α rs1800587, TNF- α rs1800629 i IL-10 rs1800896 s AB u bolesnika koji su razvili AB i ispitanika s blagim kognitivnim poremećajem .

2.2. Hipoteze

1. Promjene u koncentraciji citokina IL-1 α , TNF- α i IL-10 u serumu i različite genetičke varijante IL-1 α rs1800587, TNF- α rs1800629 i IL-10 rs1800896 bit će povezane s razvojem AB.
2. Promjene u koncentraciji citokina IL-1 α , TNF- α i IL-10 u serumu i različite genetičke varijante IL-1 α rs1800587, TNF- α rs1800629 i IL-10 rs1800896 biti će povezane s razvojem kognitivnih simptoma u AB.

2.3. Cilj istraživanja

Cilj ovog istraživanja je definirati ulogu citokina IL-1 α , TNF- α i IL-10 u bolesnika s Alzheimerovom bolesti i ispitanika s blagim kognitivnim poremećajem

Specifični ciljevi istraživanja su:

1. istražiti povezanost koncentracije IL-1 α , TNF- α i IL-10 u serumu bolesnika s AB ili s MCI;
2. istražiti povezanost koncentracije IL-1 α , TNF- α i IL-10 u serumu bolesnika s kognitivnim simptomima;
3. istražiti povezanost koncentracije IL-1 α , TNF- α i IL-10 u serumu s odgovarajućim genetičkim varijantama IL-1 α rs1800587, TNF- α rs1800629 i IL-10 rs1800896;
4. istražiti povezanost 3 različita polimorfizma za IL-1 α rs1800587, TNF- α rs1800629 i IL-10 rs1800896 s pojavom AB;
5. istražiti povezanost 3 različita polimorfizma za IL-1 α rs1800587, TNF- α rs1800629 i IL-10 rs1800896 s kognitivnim simptomima.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Ispitanici

U ovo istraživanje uključena su 174 bolesnika koji su liječeni u Klinici za psihijatriju Vrapče, Zagreb.

Dijagnozu su postavili psihijatri pomoću strukturiranog kliničkog intervjua temeljem kriterija navedenih u Dijagnostičkom i statističkom priručniku za mentalne poremećaje, 5. izdanje (DSM-V, engl. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, fifth edition*) i kriterija Nacionalnog instituta za neurološke i komunikativne poremećaje i moždani udar koji je dio američkog Nacionalnog instituta za zdravlje (NINCDS-ADRDA, engl. *National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke and Alzheimer's Disease and Related Disorders Association*). Ispitanici s AB i MCI su evaluirani također pomoću Mini mental testa (MMSE) i Testa crtanja sata (CDT).

Za ocjenu kognitivne funkcije korišten je Mini mental test (MMSE), psihometrijski test koji sadrži maksimalno 30 bodova. Ovim testom procjenjuje se memorija, pažnja, budnost, govor, orijentacija, razumijevanje, čitanje i pisanje, imenovanje i ponavljanje. Prema broju bodova testa ispitani bolesnici mogu se rangirati u nekoliko skupina:

- oni s normalnim kognitivnim sposobnostima (od 27 – 30 bodova)
- oni s blagom demencijom (od 21 – 26 bodova)
- ispitanici s umjerenom demencijom (od 10 – 20 bodova)
- ispitanici s težim oblikom demencije (manje od 10 bodova)

Test crtanja sata (CDT) koristio se kao još jedan test za procjenu ozbiljnosti demencije, a vrijeme testa je vrlo kratko. Bolesnici su dobili zadatak da nacrtaju kružnicu u koju će morati upisati brojeve i kazaljke sata koji pokazuju neko vrijeme, najčešće 11 sati i 10 minuta. Ocjenjuje se crtanje kruga (1 bod), brojeva (2 boda) i kazaljki s točnim vremenom (2 boda). Ukoliko su nacrtali sat, kazaljke i točno vrijeme ocjenjeni su kao 5/5 bez kognitivnih oštećenja. Ukoliko je rezultat od 0 – 4 boda, nalaz govori da se radi o poremećaju pamćenja i upućuje se na daljnje ispitivanje. Test crtanja sata koristi se kao jedan od testova probira ili se primjenjuje kao dio većeg protokola procjene.

Isključni kriteriji za provedbu ovog istraživanja su bili bolesnici s vaskularnom i miješanom demencijom, tumorima SŽS-a, traumama mozga, upalnim bolestima SŽS-a, sistemskim

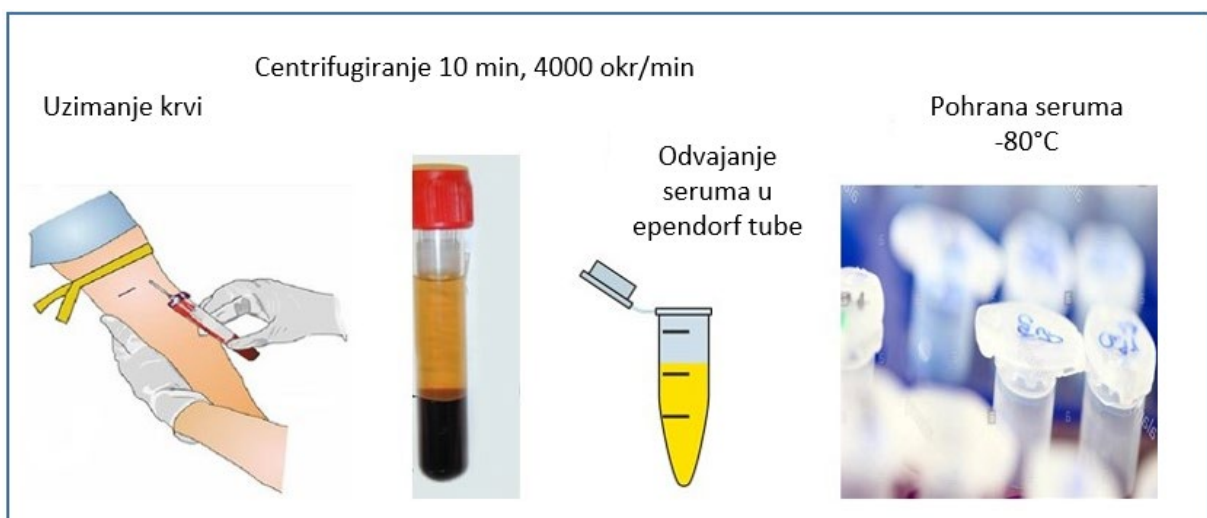
metaboličkim bolestima, neurološkim bolestima kao što je Huntingtonova bolest i Pickova demencija.

Istraživanje je provedeno uz dozvolu Etičkog povjerenstva za istraživanje Klinike za psihijatriju Vrapče nakon temeljite analize dostavljenog prijedloga istraživanja i prateće dokumentacije. Istraživanje se provelo u skladu sa svim primjenljivim smjernicama čiji je cilj osigurati pravilno provođenje istraživanja, te sigurnost osoba koje u njemu sudjeluju, uključujući „Osnove dobre kliničke prakse” i „Helsinšku deklaraciju” (engl. *Essential good clinical practice*). Kod ispitanika koji nisu mogli samostalno potpisati informirani pristanak isti je potpisan od strane skrbnika bolesnika.

3.2. Uzorci krvi

Uzorci krvi dobiveni su od 100 ispitanika s MCI (prosječna dob 71 godina) i 74 bolesnika s AB (prosječna dob 79 godina).

Svim ispitanicima uključenim u istraživanje uzeti su uzorci venske krvi u plastične vacutainer epruvete bez antikoagulansa (*Greiner Bio-One, VACUETTE® TUBE 6 ml CAT Serum Clot Activator 13×100 red cap-black ring, PREMIUM*) natašte ujutro. Uzorci krvi su uzeti tijekom uobičajenih rutinskih pregleda. Nakon vađenja uzorci su ostavljeni na sobnoj temperaturi, zatim su iscentrifugirani 10 min na 4000 okr/min i serum je odvojen u posebne plastične epruvetice (engl. *Ependorf tube 0,5 ml*). Uzorci su nakon odvajanja pohranjeni u ledenicu na -80°C . Obrada uzoraka krvi je prikazana u Slici 3.1.



Slika 3.1. Shematski prikaz obrade uzoraka krvi

3.2.1. Određivanje citokina u serumu

Koncentracija citokina u perifernoj krvi analizirana je enzimsko-imunokemijskim testom za kvantitativno određivanje humanog antigena, ELISA (engl. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) tvrtke R&D Systems[®], Inc.

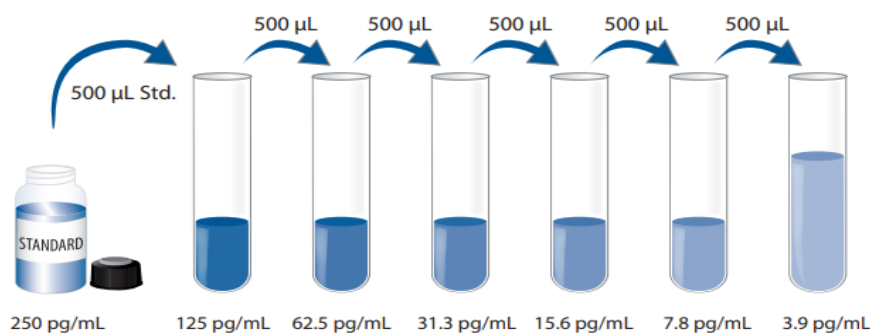
3.2.1.1 *IL-1 α*

3.2.1.2 *Kemikalije za IL-1 α*

Komercijalno dostupan ELISA komplet tvrtke R&D Systems[®], Inc. (SAD i Kanada) – *Quantikine[®] ELISA Human IL-1 α Immunoassay*:

- Mikropločica – polistirenska mikropločica s 96 jažica s obloženim mišjim monoklonalnim protutijelom koje veže IL-1 α
- IL-1 α standard – liofilizirani rekombinantni humani protein IL-1 α
- IL-1 α konjugat (engl. *IL-1 α Conjugate*) – Poliklonalna protutijela specifična za humani IL-1 α konjugirano s peroksidazom iz hrena
- Razrjeđivač kompleta RD1-83 (engl. *Assay Diluent RD1-83*) – puferirana proteinska baza
- Kalibrirajuća otopina za razrjeđivanje RD6C (engl. *Calibrator Diluent RD6C*) – životinjski serum
- Pufer za ispiranje – 25 \times koncentriran
- Reagens za obojenje A (engl. *Color Reagent A*) – stabilizirani vodikov peroksid
- Reagens za obojenje B (engl. *Color Reagent B*) – stabilizirani kromogen tetrametilbenzidin
- Otopina za zaustavljanje reakcije (engl. *Stop Solution*) – 2N sumporna kiselina

Tablica 3.1. Priprema otopina standarada humanog IL-1 α



Standardni niz	S1	S2	S3	S4	S5	S6
Koncentracija IL-1 α (pg/ml)	125	62,5	31,3	15,6	7,8	3,9

3.2.1.3 Postupak za određivanje koncentracije IL-1 α

Za određivanje koncentracije IL-1 α u serumu korišten je komercijalno dostupan ELISA komplet tvrtke R&D Systems[®], Inc. (SAD i Kanada) prema uputama koje daje proizvođač. Za određivanje koncentracije IL-1 α korištene su mikrotitarske pločice koje sadrže 96 jažica (12 \times 8) i obložene su imobiliziranim monoklonalnim protutijelom koje na sebe veže IL-1 α iz uzorka seruma. U svaku od jažica prvo je dodano 50 μ l razrjeđivača kompleta RD1-83, a zatim po 200 μ l uzorka seruma ili po 200 μ l prethodno pripremljenih razrjeđenja IL-1 α standarda i kontrole. Razrjeđenja standarda su pripremljena tako da se u konačnici dobije serija razrjeđenja različitih koncentracija (Tablica 3.1.). U 3 jažice dodani su kontrolni uzorci. Mikropločice su zatim prekrivene ljepljivom folijom i ostavljene 2 sata na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije od 2 sata jažice se ispiru, ponavljajući proces ispiranja tri puta. Nakon ispiranja u svaku jažicu dodano je po 200 μ l IL-1 α konjugata, tj. na nastali kompleks protutijela i IL-1 α dodano je drugo monoklonalno protutijelo koje specifično prepoznaje IL-1 α na koje je vezana peroksidaza iz hrena. Nakon inkubacije od 2 sata na sobnoj temperaturi, serijom od ukupno 3 ispiranja s po 400 μ l razrijeđenog pufera za ispiranje po jažici, ispiran je višak monoklonalnog protutijela koje se veže na IL-1 α iz seruma. Nakon ispiranja jažice su dobro posušene dekantiranjem. U svaku jažicu je dodano 200 μ l tzv. supstratne otopine koja je dobivena miješanjem reagensa za obojenje A i B u jednakom omjeru i koja sadržava hidrogen peroksid. Inkubira se 30 min na sobnoj temperaturi zaštićeno od svjetla. Nakon 30 min u jažice je dodano 50 μ l otopine za zaustavljanje reakcije (sumporna kiselina). Dodatkom „stop” otopine dolazi do promjene boje iz plave u žutu, a intezitet obojenja mjeri se unutar 30 min na ELISA čitaču (Thermo Labsystems Multiskan EX Microplate Reader, SAD) pri 450 nm, uz korekciju pri 540 ili

570 nm. Naknadno je prema uputama proizvođača, koristeći poznate koncentracije IL-1 α standarda, određena koncentracija IL-1 α u pojedinim jažicama.

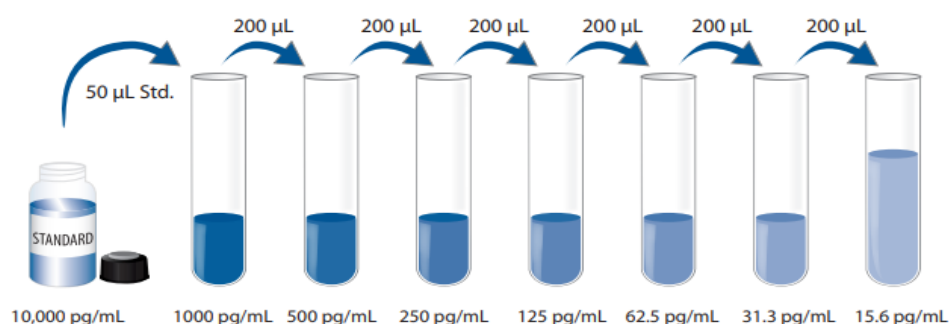
3.2.1.4 TNF- α

3.2.1.5 Kemikalije za TNF- α

Komercijalno dostupan ELISA komplet tvrtke R&D Systems[®], Inc. (SAD i Kanada) – *Quantikine[®] ELISA Human TNF- α Immunoassay*:

- Mikropločica – polistirenska mikropločica s 96 jažica s obloženim mišjim monoklonalnim protutijelom koje veže TNF- α
- TNF- α standard – liofilizirani rekombinantni humani protein TNF- α
- TNF- α konjugat (engl. *TNF- α Conjugate*) – poliklonalna protutijela specifična za humani TNF- α konjugirano s peroksidazom iz hrena
- Razrjeđivač kompleta RD1F (engl. *Assay Diluent RD1F*) – puferirana proteinska baza
- Kalibrirajuća otopina za razrjeđivanje RD6-12 (engl. *Calibrator Diluent RD6-12*) –
- Pufer za ispiranje – 25 \times koncentriran
- Reagens za obojenje A (engl. *Color Reagent A*) – stabilizirani vodikov peroksid
- Reagens za obojenje B (engl. *Color Reagent B*) – stabilizirani kromogen tetrametilbenzidin
- Otopina za zaustavljanje reakcije (engl. *Stop Solution*) – 2N sumporna kiselina

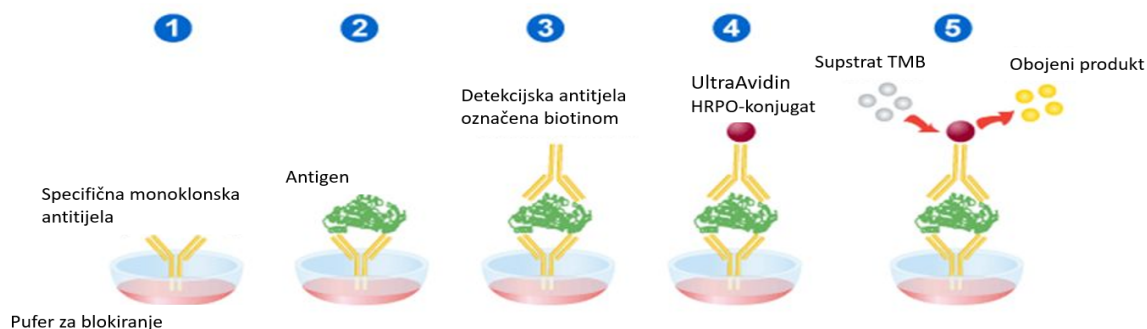
Tablica 3.2. Priprema otopina standarada humanog TNF- α



Standardni niz	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7
Koncentracija TNF- α (pg/ml)	1000	500	250	125	62,5	31,3	15,6

3.2.1.6 Postupak za određivanje koncentracije TNF- α

Za određivanje koncentracije TNF- α u serumu korišten je komercijalno dostupan ELISA komplet tvrtke R&D Systems[®], Inc. (SAD i Kanada) prema uputama koje daje proizvođač. Za određivanje koncentracije TNF- α korištene su mikrotitarske pločice koje sadrže 96 jažica (12 \times 8) i obložene su imobiliziranim monoklonalnim protutijelom koje na sebe veže TNF- α iz uzorka seruma. U svaku od jažica prvo je dodano 50 μ l razrjeđivača kompleta RD1F, a zatim po 50 μ l uzorka seruma ili po 50 μ l prethodno pripremljenih razrjeđenja TNF- α standarda i kontrole. Razrjeđenja standarda su pripremljena tako da se u konačnici dobije serija razrjeđenja različitih koncentracija (Tablica 3.2.). U 3 jažice dodani su kontrolni uzorci. Mikropločice su zatim prekrivene ljepljivom folijom i ostavljene 2 sata na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije od 2 sata jažice se ispiru, ponavljajući proces ispiranja tri puta. Nakon ispiranja u svaku jažicu dodano je po 200 μ l TNF- α konjugata, tj. na nastali kompleks protutijela i TNF- α dodano je drugo monoklonalno protutijelo koje specifično prepoznaje TNF- α na koje je vezana peroksidaza iz hrena. Nakon inkubacije od 2 sata na sobnoj temperaturi, serijom od ukupno 3 ispiranja s po 400 μ l razrijeđenog pufera za ispiranje po jažici, ispiran je višak monoklonalnog protutijela koje se veže na TNF- α iz seruma. Nakon ispiranja jažice su dobro posušene dekantiranjem. U svaku jažicu je dodano 200 μ l tzv. supstratne otopine koja je dobivena miješanjem reagensa za obojenje A i B u jednakom omjeru i koja sadržava hidrogen-peroksid. Inkubira se 30 min na sobnoj temperaturi zaštićeno od svjetla. Nakon 30 min u jažice je dodano 50 μ l otopine za zaustavljanje reakcije (sumporna kiselina). Dodatkom „stop” otopine dolazi do promjene boje iz plave u žutu, a intezitet obojenja mjeri se unutar 30 min na ELISA čitaču (*Thermo Labsystems Multiskan EX Microplate Reader*, SAD) pri 450 nm, uz korekciju pri 540 ili 570 nm. Naknadno je prema uputama proizvođača, koristeći poznate koncentracije TNF- α standarda, određena koncentracija TNF- α u pojedinim jažicama.



- 1** a) mikrotitarska pločica je obložena specifičnim monoklonalnim antitijelom
b) pufer za blokiranje se dodaje da blokira preostala mjesta vezanja proteina na ploči
- 2** uzorak će se dodati u jažice na pločicu i prisutni antigen će se vezati za antitijelo
- 3** nakon ispiranja na ploču se dodaje anti-humano detekcijsko (specifično) antitijelo označeno biotinom, koje će se vezati na antigen
- 4** nevezana detekcijska antitijela se ispiru i dodaje se UltraAvidin HRPO-konjugat i veže se za biotinom obilježena detekcijska antitijela
- 5** dodaje se supstrat TMB koji s enzimom daje obojeni signal plave boje (stop otopina-mijenja plavo obojenje u žuto) i intenzitet obojenja mjeri se fotometrijski na 450 nm

Slika 3.2. ELISA „sendvič” metoda (engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*)

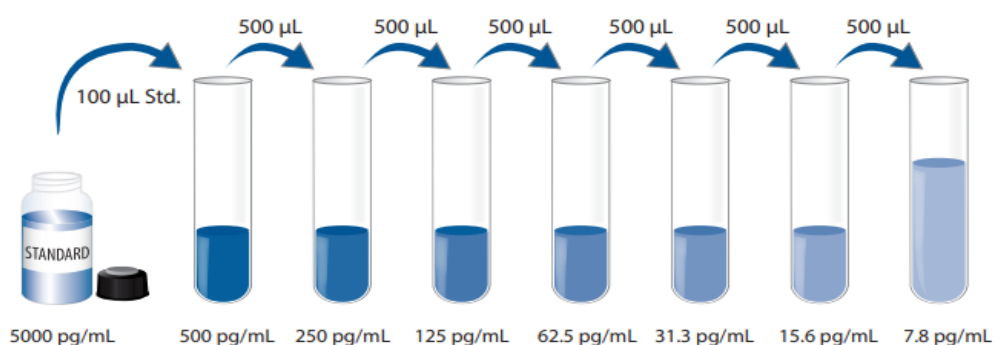
3.2.1.7 IL-10

3.2.1.8 Kemikalije za određivanje koncentracije IL-10

Komercijalno dostupan ELISA komplet tvrtke R&D Systems®, Inc. (SAD i Kanada) – *Quantikine® ELISA Human IL-10 Immunoassay*:

- Mikropločica – polistirenska mikropločica s 96 jažica s obloženim mišjim monoklonalnim protutijelom koje veže IL-10
- IL-10 standard – liofilizirani rekombinantni humani protein IL-10
- IL-10 konjugat (engl. *IL-10 Conjugate*) – monoklonalno protutijelo koje veže IL-10 konjugirano s peroksidazom iz hrena
- Razrjeđivač kompleta RD1W (engl. *Assay Diluent RD1W*) – puferirana proteinska baza
- Kalibrirajuća otopina za razrjeđivanje RD6P (engl. *Calibrator Diluent RD6P*) – životinjski serum
- Pufer za ispiranje – 25× koncentriran
- Reagens za obojenje A (engl. *Color Reagent A*) – stabilizirani vodikov peroksid
- Reagens za obojenje B (engl. *Color Reagent B*) – stabilizirani kromogen tetrametilbenzidin
- Otopina za zaustavljanje reakcije (engl. *Stop Solution*) – 2N sumporna kiselina

Tablica 3.3. Priprema standardnih otopina humani IL-10



Standardni niz	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7
Koncentracija IL-10 (pg/ml)	500	250	125	62,5	31,3	15,6	7,8

3.2.1.8.1 Postupak za određivanje IL-10

Za određivanje koncentracije IL-10 u plazmi korišten je komercijalno dostupan ELISA komplet tvrtke R&D Systems®, Inc. (SAD i Kanada) prema uputama koje daje proizvođač. Za određivanje koncentracije IL-10 korištene su mikrotitarske pločice koje sadrže 96 jažica (12 × 8) i obložene su imobiliziranim monoklonalnim protutijelom koje na sebe veže IL-10 iz uzorka seruma. U svaku od jažica prvo je dodano 50 µl razrjeđivača kompleta RD1W, a zatim po 200 µl uzorka seruma ili po 200 µl prethodno pripremljenih razrjeđenja IL-10 standarda i kontrole. Razrjeđenja standarda su pripremljena tako da se u konačnici dobije serija razrjeđenja različitih koncentracija (Tablica 3.3.). U 3 jažice dodane su kontrole (niske, srednje i visoke vrijednosti). Mikropločice su zatim prekrivene ljepljivom folijom i ostavljene 2 sata na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije od 2 sata jažice se ispiru, ponavljajući proces ispiranja tri puta. Nakon ispiranja u svaku jažicu dodano je po 200 µl IL-10 konjugata, tj. na nastali kompleks protutijela i IL-10 dodano je drugo monoklonalno protutijelo koje specifično prepoznaje IL-10 i na koje je vezana peroksidaza iz hrena. Nakon inkubacije od 2 sata na sobnoj temperaturi, serijom od ukupno 3 ispiranja s po 400 µl razrijeđenog pufera za ispiranje po jažici, ispiran je višak monoklonalnog protutijela koje se veže na IL-10 iz seruma. Nakon ispiranja jažice su dobro posušene dekantiranjem. U svaku jažicu je dodano 200 µl tzv. supstratne otopine koja je dobivena miješanjem reagensa za obojenje A i B u jednakom omjeru i koja sadržava hidrogenperoksid. Inkubira se 30 min na sobnoj temperaturi zaštićeno od svijetla. Nakon 30 min u jažice je dodano 50 µl otopine za zaustavljanje reakcije (sumporna kiselina). Dodatkom „stop” otopine dolazi do promijene boje iz plave u žutu, a intezitet obojenja mjeri se unutar 30 min na

ELISA čitaču (Thermo Labsystems Multiskan EX Microplate Reader, SAD) pri 450 nm, uz korekciju pri 540 ili 570 nm. Naknadno je prema uputama proizvođača, koristeći poznate koncentracije IL-10 standarda, određena koncentracija IL-10 u pojedinim jažicama.

3.3. Izolacija genomske DNA iz krvi

Genomska DNA izdvojena je iz pune krvi metodom izoliranja po Milleru i suradnicima (1988).

Za izolaciju genomske DNA uzeti su uzorci venske krvi s antikoagulantom koji sadrži antiokoagulant ACD (engl. *Acid Citrat Dextrose*). Izdvajanje genomske DNA iz pune krvi provodilo se metodom izoliranja (Miller i sur., 1988). Metoda se temelji na lizi eritrocita i kemijskoj i enzimskoj ekstrakciji sa svrhom uklanjanja staničnih proteina, RNA i drugih makromolekula, nakon čega se DNA taloži u apsolutnom alkoholu. Izolacija DNA metodom izoliranja temelji se na taloženju proteina pri velikoj koncentraciji soli. Protokol metode izolacije DNA objavili su 1988. godine Miller i suradnici. Protokol podrazumijeva lizu stanica sa SDS lizirajućim puferom i proteinazom K. SDS pufer otapa lipidne membrane i dolazi do lize stanice. Proteinaza K katabolizira razgradnju proteina, hidrolizom peptidnih veza koje povezuju aminokiseline u peptidnom lancu. Time se omogućuje oslobađanje neoštećene DNA iz stanice (ChaconCortes i Griffith, 2014).

Kemikalije za izolaciju DNA:

- otopina za lizu eritrocita RCLB (engl. *Red Cell Lysis Buffer*) 10 mM Tris (Trizma base, Sigma Aldrich, SAD), 5 mM MgCl₂ (Kemika, Hrvatska), 10 mM NaCl (Kemika, Hrvatska); pH 7,6
- pufer SE – 75 mM NaCl, 25 mM EDTA (Sigma Aldrich, SAD); pH 8
- 5 M otopina NaCl (Kemika, Hrvatska)
- proteinaza K (20 mg/ml) (TaKaRa, SAD)
- 10 % natrijev dodecil sulfat (SDS) (Sigma Aldrich, SAD)
- etanol (Kemika, Hrvatska) 96 %, 70 %
- izopropanol (Kemika, Hrvatska)
- pufer TE – 10 mM Tris (Trizma base, Sigma Aldrich, SAD), 1 mM EDTA; pH 7,6 (Sigma Aldrich, SAD)

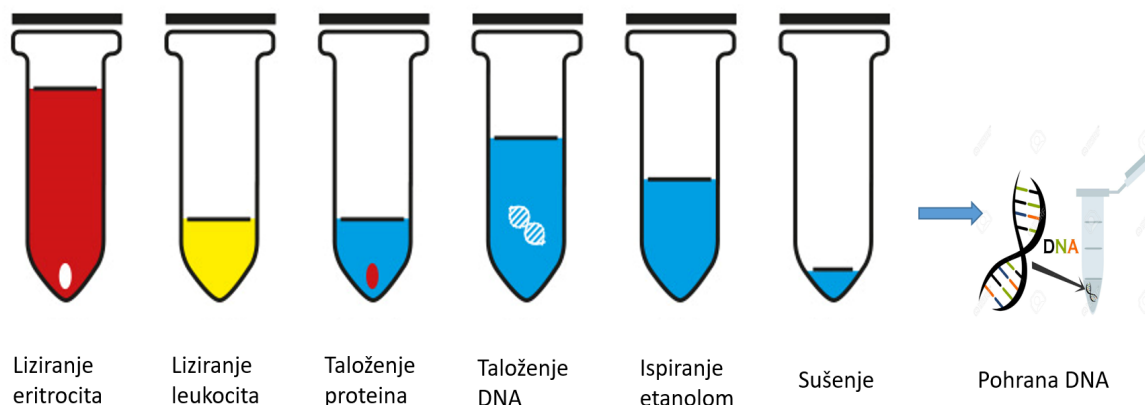
3.3.1. Postupak izolacije DNA

Svaki uzorak krvi s antikoagulansom ACD, nakon odmrzavanja uzorka, miješa se 20 min na valjkastoj mješalici te se nakon toga iz njega odvoji 300 μ l krvi u Eppendorf plastične epruvetice od 1,5 ml (Eppendorf, Njemačka). Doda se 900 μ l pufera za lizu eritrocita RCLB (engl. *red cell lysis buffer*), dobro promiješa vorteks mješalicom i inkubira se 10 min na ledu. Uzorci se iscentrifugiraju ($13000 \times g$, 2 min, $4^\circ C$) pri čemu lizirani eritrociti ostanu u supernatantu, a očuvani leukociti se istalože na dnu epruvetice. Supernatant se ukloni, a talog se po potrebi pročišćava resuspendiranjem u RCLB-u (900 μ l) i centrifugiranjem ($13000 \times g$, 2 min, $4^\circ C$). Na dovoljno čisti talog dodaje se 300 μ l SE pufera i 30 μ l 10 %-tnog SDS-a, lagano se promiješa okretanjem mikroeprevete te se doda još 1,5 μ l proteinaze K. Slijedi inkubacija uzoraka u grijaćem bloku 2 sata na $56^\circ C$ pri čemu leukociti liziraju. Nakon inkubacije, dodaje se 110 μ l 5 mM NaCl i sve skupa promiješa vorteks mješalicom 10 s. Slijedi centrifugiranje ($13000 \times g$, 5 min, sobna temperatura) kojim se DNA dobije u supernatantu, a ostali stanični dijelovi su u talogu. Supernatant se prelije u novu sterilnu eppendorf plastičnu epruveticu, dodaju se 2 volumna udjela ($\approx 800 \mu$ l) hladnog izopropanola te se lagano promiješa. Pritom dolazi do taloženja DNA te je ona vidljiva u obliku netopivog spleta. Centrifugiranjem 2 min na $13000 \times g$, talog se spušta na dno mikroeprevete. Supernatant se odlije, a talog ispire dodatkom 200 μ l 75 %-tnog etanola i centrifugiranjem 2 min na $13000 \times g$ pri sobnoj temperaturi. Supernatant se odlije, mikroeprevete dodatno posuše prislanjanjem na papir i sušenjem 20 min s otvorenim poklopcem u digestoru. Osušenom talogu se dodaje 100 μ l TE pufera te se ostavi preko noći na sobnoj temperaturi kako bi se DNA u potpunosti otopila. Nakon toga uzorci se mogu pohraniti na $+4^\circ C$.

3.3.2. Određivanje koncentracije i čistoće DNA

DNA zbog svoje strukture apsorbira svjetlost određene valne duljine. DNA maksimalno apsorbira svjetlost pri valnoj duljini 260 nm. Postoji linearan odnos između količine apsorbirane svjetlosti i koncentracije DNA (Pećina-Šlaus, 2009). Apsorbancija je logaritam omjera intenziteta ulaznog zračenja i zračenja propuštenog kroz uzorak, a prema Beer-Lambertovom zakonu je jednaka umnošku koncentracije, molarnog ekstinkcijskog koeficijenta i debljine kivete. Molarni ekstinkcijski koeficijent je mjera jakosti apsorpcije svjetlosti neke tvari i konstantna je za zadanu tvar (Harris, 2010). Prosječni ekstinkcijski koeficijent dvolančane DNA iznosi 50 (μ g/ml)/cm, što znači da se za apsorbciju jednaku 1 pri 260 nm dobiva približna koncentracija DNA od 50 μ g/ml. Zato se koncentracija DNA računa prema sljedećoj jednadžbi: koncentracija DNA (μ g/ml) = $A_{260} \times 50 \mu$ g/ml \times faktor razrjeđenja.

Čistoća DNA pokazuje u kolikoj su mjeri u izoliranoj otopini DNA prisutne i druge molekule. Za određivanje čistoće DNA određuje se omjer apsorbancija na dvije valne duljine – 260 i 280 nm. Na valnoj duljini 280 nm apsorbiraju se aromatske aminokiseline i peptidi, te spojevi s aromatskim prstenom, primjerice fenol koji se ponekad koristi tijekom izolacije. Za otopinu s omjerom A260/A280 od 1,8 do 2,0 smatra se da sadrži čistu DNA. Manje vrijednosti upućuju na kontaminaciju proteinima, a više na kontaminaciju s RNA (Pećina-Šlaus, 2009).



Slika 3.3. Izolacija DNA metodom iseljavanja

3.4. Genotipizacija obzirom na polimorfizme gena *IL-1 α* rs1800587, *TNF- α* rs1800629 i *IL-10* rs1800896

3.4.1. Kemikalije

Komercijalno dostupni kompleti Applied Biosystems[®], SAD):

- TaqMan[®] mješavina početnica i proba izrađena po narudžbi (engl. *TaqMan[®] Pre-designed SNP Genotyping Assay*)
- Pristupni broj za Applied Biosystems[®] – C_1747360_10 (rs1800896), C_9546481_30 (rs1800587), C_7514879_10(rs1800629)
- Otopina za genotipizaciju (Applied Biosystems[®], SAD) – TaqMan[®] matična mješavina za genotipizaciju (engl. *TaqMan[®] Genotyping Master Mix*)

3.4.2. Postupak genotipiziranja *IL-1 α* rs1800587, *TNF- α* rs1800629 i *IL-10* rs1800896

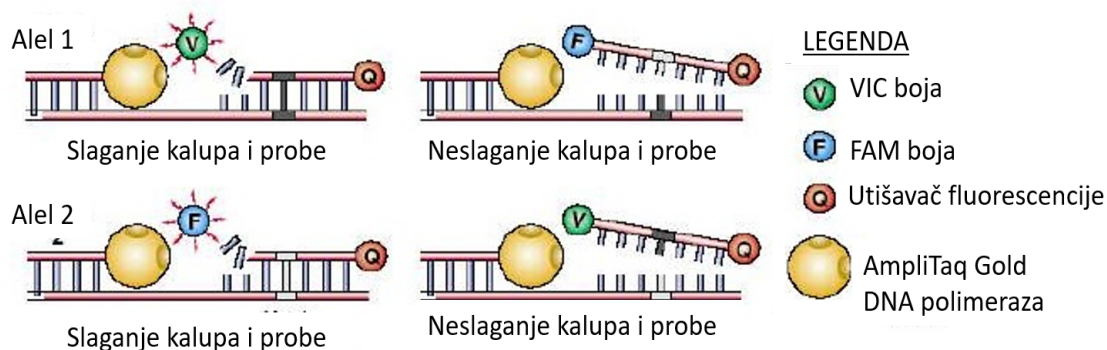
Određivanje genotipa s obzirom na spomenute polimorfizme napravljeno je metodom PCR-a u stvarnom vremenu (engl. *real time PCR*) korištenjem komercijalno dostupnih TaqMan[®] mješavina početnica i proba (Applied Biosystems[®], SAD), koje sadrže specifične početnice,

TaqMan[®] sonde obilježene fluorescentnom bojom VIC ili FAM i reakcijski pufer. Uz te komplete korištena je i TaqMan[®] otopina za genotipizaciju (Applied Biosystems[®], SAD) u kojoj se nalazi termostabilna DNA-polimeraza, deoksiribonukleotidi te pufer koji osigurava optimalne uvijete za aktivnost DNA-polimeraze. Tijekom lančane reakcije polimerazom, Taq polimeraza produžuje neoznačene početnice prema lancu genomske DNA kao predlošku. Kad enzim dosegne TaqMan probu, cijepa molekulu DNA, udaljavajući fluorescentnu boju od prigušivača. Detektira se fluorescencija FAM ili VIC boje što rezultira detekcijom specifičnog alela. Reakcija se izvodi u ukupnom volumenu od 10 µl s 20 ng genomske DNA. Početna denaturacija se provodi kroz 10 minuta pri 95 °C. Nakon toga slijedi 45 ciklusa denaturacije (15 sekundi, 92 °C) i vezivanja početnica/produljivanje DNA (1 minuta, 60 °C). Za genotipizaciju uzoraka korišten je uređaj ABI Prism7300 Real time PCR System apparatus (Applied Biosystems[®], SAD).

Metoda prikazana shematski slikom (Slika 3.4.) se temelji na hibridizaciji fluorescentno obilježenih oligonukleotidnih proba i njima komplementarnih polimorfnih mjesta na genomskoj DNA. Svaka od dviju proba u reakcijskoj smjesi je na 5' kraju obilježena jednom fluorescentnom bojom (VIC i FAM) i specifično se veže za slijed koji sadrži 1 promijenjenu bazu. Na 3' kraju obje probe imaju vezan utišivač fluorescencije NFQ (engl. *nonfluorescent quencher*). Kada je proba vezana za komplementarni slijed na lancu DNA, koji ujedno služi i kao kalup u lančanoj reakciji polimeraze, utišivač i boja se nalaze na takvoj udaljenosti koja omogućuje utišivaču da spriječi fluorescenciju boje. Prilikom produljivanja početnica termostabilna DNA polimeraza pocijepa vezane probe, boja više nije pod utjecajem utišivača te počinje fluorescirati što se bilježi uređajem kao signal. Jačina i vrsta dobivenog signala omogućuje određivanje genotipa. Fluorescencija jedne boje upućuje na homozigotnost jednog alela, a fluorescencija obje boje upućuje na prisutnost oba alela, tj. heterozigotnost.

SNP genotipizacija

Multiplex Taqman test za SNP genotipizaciju



VIC fluorescencija signal	homozigot za alel 1
FAM fluorescencija signal	homozigot za alel 2
Oba fluorescentna signala	heterozigot

Slika 3.4. Shematski prikaz metode lančane reakcije polimeraze u stvarnom vremenu (Preuzeto i prilagođeno: Applied Biosystems®, SAD).

Sastav reakcijske smjese i uvjeti reakcije prikazani su u tablicama 3.4 i 3.5.

Tablica 3.4. Sastav reakcijske smjese prilikom genotipizacije metodom PCR-a u stvarnom vremenu

Reakcijska smjesa	Volumen ¹ /μl		
	IL-1α	TNF-α	IL-10
TaqMan univerzalna matična mješavina	5,00	5,00	5,00
TaqMan mješavina proba i početnica ²	0,25	0,25	0,25
TE pufer	0,25	0,25	0,25
DNA (1 – 20 ng) otopljena u vodi	4,50	4,50	4,50
Ukupni reakcijski volumen	10 μl	10 μl	10 μl

¹ Volumen se prilagođava razmjerno ukupnom volumenu reakcijske smjese; ² Pristupni broj kod Applied Biosystems®.

Tablica 3.5. Uvjeti reakcije prilikom genotipizacije metodom PCR-a u stvarnom vremenu

	IL-1 α , TNF- α , IL-10	
Korak	Temperatura	Vrijeme
Početni koraci	95 °C	10 min
Denaturacija	92 °C	15 s
Vežanje i produljenje početnica	60 °C	1 min
<i>Broj ciklusa</i>	45	

Prije samog početka reakcije umnažanja genomske DNA, uređaj bilježi početnu, a po završetku reakcije, konačnu razinu fluorescencije u reakcijskoj smjesi. Računalni program daje prikaz razine fluorescencije za svaku fluorescentnu boju, a konačan prikaz rezultata uključuje ispis razine fluorescencije za svaku boju te grafički prikaz.

3.5. Statistička obrada podataka

Statistička obrada rezultata napravljena je pomoću statističkog programa R, inačica 3.6.2. i pomoću sljedećih programskih paketa – *rcompanion*, *FSA*, *expss*, *readxl*, *xlsx*, *foreign*, *car*, *corrplot*, *ggcorrplot*, *data.table*, *table1*, *effects*, *nlme*, *multcomp*, *RColorBrewer*, *knitr*, *kableExtra*, *tidyverse*, *dplyr*, *ggpubr*, *genetics*, *HardyWeinberg*. Shapiro-Wilk test je korišten za utvrđivanje presumpcije normalne distribucije za sve skupine i podskupine podataka (Ghasemi i Zahediasl, 2012). Rezultati su prikazani deskriptivno u tablicama i grafički. Za varijable koje nisu normalno raspodijeljene primijenjeni su neparametrijski testovi i rezultati su izraženi kao medijan i minimum-maksimum raspon. Prije testiranja frekvencija genotipova proveden je χ^2 -test kako bi se identificiralo potencijalno odstupanje od Hardy-Weinbergovog ekvilibrijuma (HWE). Frekvencije demografija, genotipova i alela su uspoređivane pomoću χ^2 -testa, kao veličina učinka za frekvencije korišteno je Cramerovo V (ϕ_c). Interpretacija Cramerovog V za 2 stupnja slobodne je: 0,1 – 0,3 mala razlika; 0,3 – 0,5 srednja razlika i > 0,5 velika razlika (Akoglu, 2018).

Kod usporedbe dvije grupe podataka korišten je Mann-Whitney test. Za veličinu učinka nakon Mann-Whitney testa korištene su Cliffova δ i Varghino Delaneyvo A (VDA). VDA je korišteno kod većine usporedba jer je jednostavna za razumijevanje i laicima, a Cliffovo δ je korišteno kod usporedbe starosti između skupina kada nije logično govoriti o postotcima. Navedene veličine efekta su linearno povezane i lako je izračunati jednu iz druge. Interpretacija Cliffove δ je: 0,11 – 0,28 mala razlika; 0,28 – 0,43 srednja razlika i \geq 0,43 velika razlika. Interpretacija

VDA je: $0,56 - < 0,64$ ($< 0,34 - 0,44$) mala razlika; $0,64 - < 0,71$ ($> 0,29 - 0,34$) srednja razlika i $\geq 0,71$ ($\leq 0,29$) velika razlika (Vargha i Delaney, 2000). Kod usporedbe tri ili više skupina podataka korišten je neparametrijski Kruskal-Wallis test. Nakon značajne Kruskal-Wallisove analize rangova korišten je Dunnov test multiple komparacije te VDA za veličinu učinka. Za korekciju p – vrijednosti uslijed multiplom testiranja korištena je Benjamini – Hochbergova korekcija (engl. *false discovery rate*) (Benjamini i sur., 1995). Demografske varijable, kognitivne i laboratorijske varijable su korelirane pomoću Spearmanovog koeficijenta korelacije jer nije bilo moguće pretpostaviti normalnu distribuciju podataka. Multiplom, linearnom regresijom testirane su demografske varijable kao prediktori laboratorijskih varijabli. Prije interpretacije linearnog, regresijskog modela testirane su pretpostavke – linearne povezanosti prediktora i ishoda, normalnosti reziduala, homoskedastičnosti varijanci, izostanak multikolinearnosti te izostanaka ekstremnih vrijednosti koje bi mogle imati negativan efekt na model. Razina značajnosti postavljena je na $< 0,05$.

4. REZULTATI

4.1. Regresijska analiza demografskih čimbenika na ishod koncentracije citokina IL-1 α , TNF- α i IL-10 kod ispitanika s Alzheimerovom bolešću

Prvo su učinjene regresijske analize koje su uzele u obzir dob i spol, kako bi se utvrdilo mogu li te varijable (dob, spol) pokazati prediktivne vrijednosti na koncentracije citokina u serumu ispitanika s AB i MCI. Regresijske analize su napravljene ponaosob za svaki citokin te za ispitanike s AB ili s MCI.

4.1.1. Regresijska analiza demografskih čimbenika na ishod koncentracije citokina IL-1 α kod ispitanika s Alzheimerovom bolešću

Tablica 4.1. Multipla linearna regresija dobi i spola na koncentraciju citokina IL-1 α u ispitanika s Alzheimerovom bolešću

Prediktor	Koeficijent	SE	t	p	95 % CI
Godine	0,005	0,005	0,859	0,39	-0,24; 0,20
Spol	-0,049	0,082	-0,594	0,55	-2,8; 3,43
Korigirani R ² = -0,013; F = 0,528; p = 0,59					

Prema Tablici 4.1., multipla linearna regresija pokazuje kako dob i spol nisu značajni prediktori koncentracije citokina IL-1 α u ispitanika s AB.

4.1.2. Regresijska analiza demografskih čimbenika na ishod koncentracije citokina TNF- α kod ispitanika s Alzheimerovom bolešću

Tablica 4.2. Multipla linearna regresija dobi i spola na koncentraciju citokina TNF- α u ispitanika s Alzheimerovom bolešću

Prediktor	Koeficijent	SE	t	p	95 % CI
Godine	-0,0176	0,0948	-0,186	0,98	-0,24; 0,20
Spol	0,3199	1,3488	0,237	0,97	-2,79; 3,43
Korigirani R ² = -0,027; F = 0,043; p = 0,95					

Prema Tablici 4.2., model pokazuje kako dob i spol nisu značajni prediktori koncentracije citokina TNF- α u ispitanika s AB.

4.1.3. Regresijska analiza demografskih čimbenika na ishod koncentracije citokina IL-10 kod ispitanika s Alzheimerovom bolesti

Tablica 4.3. Multipla linearna regresija dobi i spola na koncentraciju citokina IL-10 u ispitanika s Alzheimerovom bolesti

Prediktor	Koeficijent	SE	t	p	95 % CI
Godine	-0,538	2,196	-0,245	0,81	-0,008; 0,01
Spol	36,07	32,07	1,125	0,268	-39,31; 111,45

Korigirani R2 = -0,032; F = 0,651; p = 0,52

Prema Tablici 4.3., model pokazuje kako dob i spol nisu značajni prediktori koncentracije citokina IL-10 u ispitanika s AB.

4.2. Regresijska analiza demografskih čimbenika na ishod koncentracije citokina TNF- α , IL-1 α , IL-10 kod ispitanika s blagim kognitivnim poremećajem

4.2.1. Regresijska analiza demografskih čimbenika na ishod koncentracije citokina IL-1 α kod ispitanika s blagim kognitivnim poremećajem

Tablica 4.4. Multipla linearna regresija dobi i spola na koncentraciju citokina IL-1 α u ispitanika s blagim kognitivnim poremećajem

Prediktor	Koeficijent	SE	t	p	95 % CI
Godine	0,008	0,004	0,29	0,77	-0,07; 0,09
Spol	0,519	0,413	1,254	0,21	-0,42; 1,46

Korigirani R2 = -0,004; F = 0,79; p = 0,46

Prema Tablici 4.4., model pokazuje kako dob i spol nisu značajni prediktori koncentracije citokina IL-1 α u ispitanika s MCI.

4.2.2. Regresijska analiza demografskih čimbenika na ishod koncentracije citokina TNF- α kod ispitanika s blagim kognitivnim poremećajem

Tablica 4.5. Multipla linearna regresija dobi i spola na koncentraciju citokina TNF- α u ispitanika s blagim kognitivnim poremećajem

Prediktor	Koeficijent	SE	t	p	95 % CI
Godine	0,199	0,136	1,461	0,15	-0,11; 0,51
Spol	1,006	1,568	0,64	0,52	-2,56; 4,57
Korigirani R2 = -0,023; F = 1,158; p = 0,32					

Prema Tablici 4.5., model pokazuje kako dob i spol nisu značajni prediktori koncentracije citokina TNF- α u ispitanika s MCI.

4.2.3. Regresijska analiza demografskih čimbenika na ishod koncentracije citokina IL-10 kod ispitanika s blagim kognitivnim poremećajem

Tablica 4.6. Multipla linearna regresija dobi i spola na koncentraciju citokina IL-10 u ispitanika s blagim kognitivnim poremećajem

Prediktor	Koeficijent	SE	t	p	95 % CI
Godine	0,036	0,157	0,23	0,82	-0,32; 0,39
Spol	-1,77	1,85	-0,96	0,34	-6,03; 2,47
Korigirani R2 = -0,01; F = 0,52; p = 0,6					

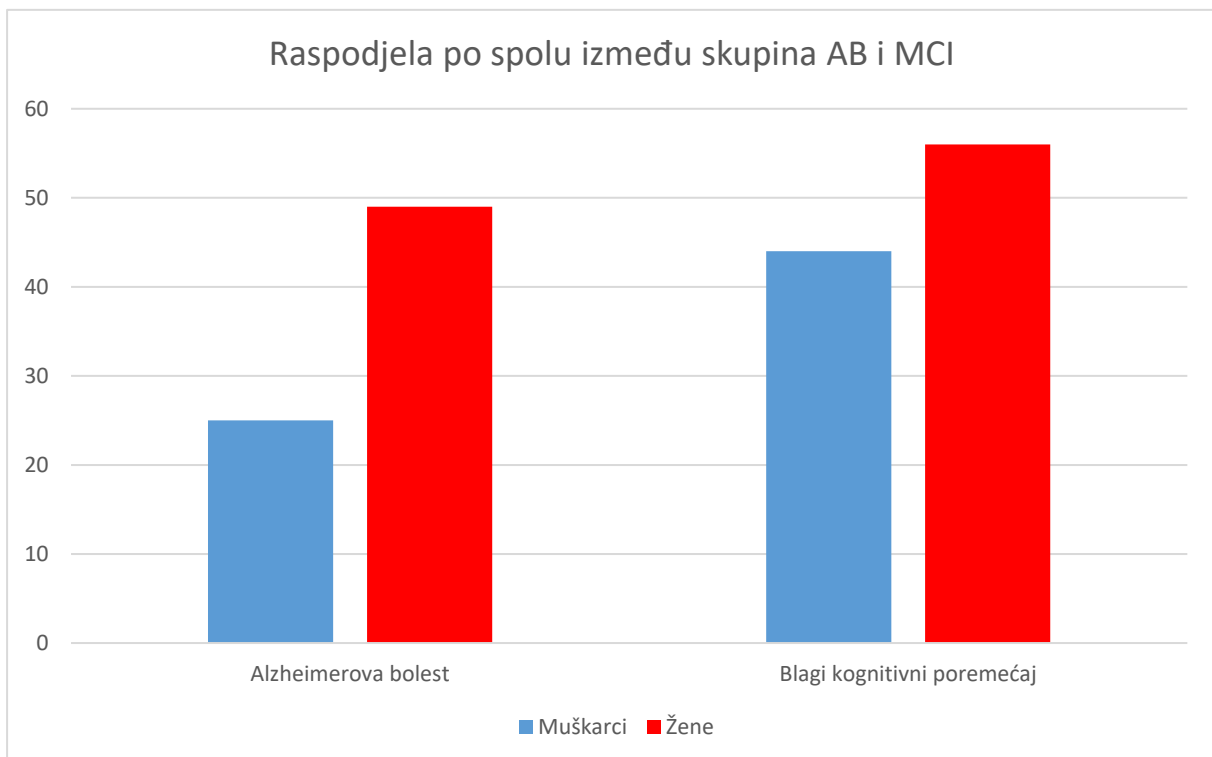
Prema Tablici 4.6., model pokazuje kako dob i spol nisu značajni prediktori koncentracije citokina IL-10 u ispitanika s MCI.

Sve su pojedine regresijske analize potvrdile da dob i spol nisu značajni prediktori koncentracije citokina TNF- α , IL-1 α , IL-10 bilo kod ispitanika s Alzheimerovom bolesti ili kod ispitanika s blagim kognitivnim poremećajem (Tablice 4.1 – 4.6).

4.3. Demografski podaci

4.3.1. Spol ispitanika

U istraživanje je bilo uključeno ukupno 174 ispitanika od kojih je bilo 69 muškaraca i 105 žena (Slika 4.1.). Udio ženskih ispitanica kod MCI bio je 56 %, a kod AB 66 % (Tablica 4.7.), no nisu postojale značajne razlike u zastupljenosti ispitanika prema spolu između ispitanika s AB i MCI testirane χ^2 -testom. Utvrđeno je da nema značajne razlike u raspodjeli ispitanika prema spolu ($\chi^2 = 1,45$; $p = 0,23$).



Slika 4.1. Prikaz raspodjele ispitanika po spolu između ispitanika s Alzheimerovom bolesti ili kod ispitanika s blagim kognitivnim poremećajem – rezultati su prikazani numerički (broj ispitanika po spolu). AB – Alzheimerova bolest, MCI – blagi kognitivni poremećaj (engl. *Mild cognitive impairment*).

4.3.2. Dob ispitanika

Prosječna dob svih ispitanika uključenih u istraživanje bila je 79 godina (raspon 57 – 89). Dob unutar ispitanika s AB nije slijedila normalnu raspodjelu ($W = 0,92$; $p < 0,001$) dok je unutar ispitanika s MCI dob bila normalno raspodijeljena ($W = 0,99$; $p = 0,51$). Utvrđene su značajne razlike (Mann-Whitney test) u dobi između ispitanika s AB i MCI ($U = 6063,5$; $p < 0,001$), jer su ispitanici s AB bili značajno stariji od ispitanika s MCI (Tablica 4.7.).

Tablica 4.7. Deskriptivni demografski i kognitivni pokazatelji kod ispitanika s Alzheimerovom bolesti i blagim kognitivnim poremećajem

Demografski i kognitivni pokazatelji	Alzheimerova bolest (n = 74)	Blagi kognitivni poremećaj (n = 100)
<i>Spol</i>		
Muški	25 (33,8 %)	44 (44,0 %)
Ženski	49 (66,2 %)	56 (56,0 %)
<i>Starost (dob)</i>		
Medijan [Min; Max]	81,5 [63,0; 89,0]	72,0 [57,0; 87,0]
<i>MMSE test</i>		
Medijan [Min; Max]	13,0 [10,0; 26,0]	27,0 [18,0; 28,0]
<i>Ispitanici prema Testu crtanja sata</i>		
Medijan [Min; Max]	1,50 [0,00; 5,00]	5,00 [1,00; 5,00]

MMSE – Mini-mental test

Tablica 4.8. Broj bodova na Mini-mental testu i Testu crtanja sata kod muških i ženskih ispitanika s Alzheimerovom bolesti

	Muški spol (n = 25)	Ženski spol (n = 49)
<i>Test crtanja sata</i>		
Medijan [Min; Max]	2,00 [0,00; 3,00]	1,00 [0,00; 5,00]
<i>MMSE test</i>		
Medijan [Min; Max]	14,0 [10,0; 26,0]	13,0 [10,0; 24,0]

MMSE – Mini-mental test

Tablica 4.9. Broj bodova na Mini mental testu i Testu crtanja sata kod muških i ženskih ispitanika s blagim kognitivnim poremećajem

	Muški spol (n = 44)	Ženski spol (n = 56)
<i>Test crtanja sata</i>		
Medijan [Min; Max]	4,00 [3,00; 5,00]	5,00 [1,00; 5,00]
<i>MMSE test</i>		
Medijan [Min; Max]	27,0 [18,0; 28,0]	27,0 [18,0; 28,0]

MMSE – Mini-mental test.

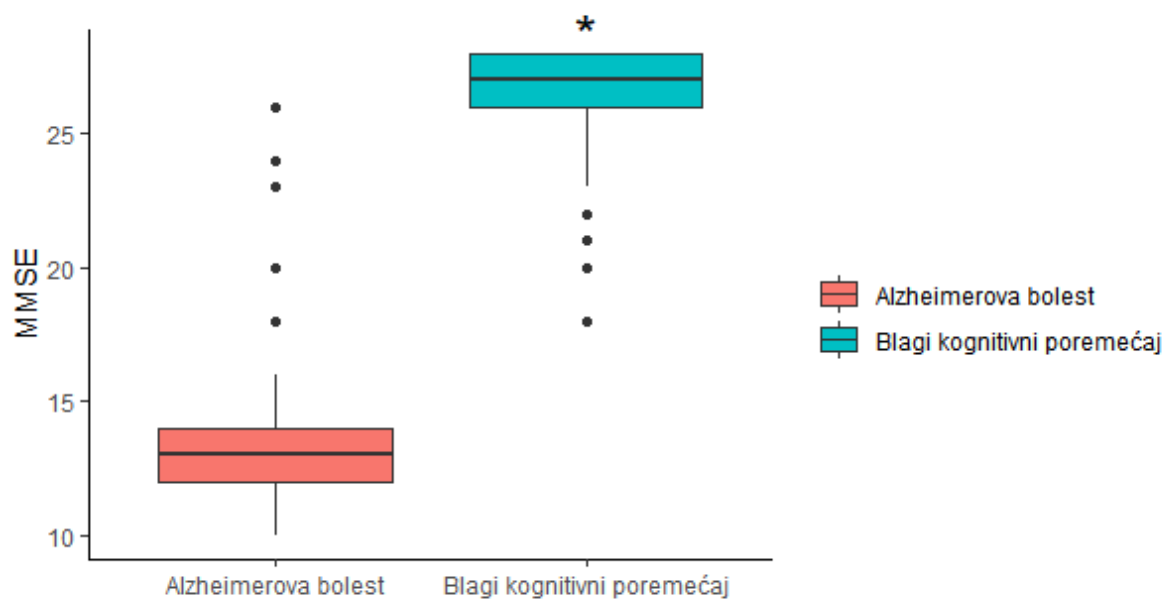
U Tablicama 4.7., 4.8. i 4.9. su prikazani demografski parametri kao što su spol i starost (dob), rezultati kognitivnih skala nakon MMSE testa i rezultati Testa crtanja sata, te broj bodova na kognitivnim skalama u ispitanika s AB i MCI podijeljenih po spolu.

Rezultati broja bodova na MMSE testu, koji su odstupali od normalne razdiobe kod ispitanika oba spola s AB, nisu se značajno ($U = 718,5; p = 0,22$; Mann-Whitney test) razlikovali između muških i ženskih ispitanika s AB (Tablica 4.8.). Prema Mann-Whitney testu nisu utvrđene značajne ($U = 998; p = 0,09$) razlike u broju bodova na MMSE testu između muških i ženskih ispitanika s MCI (Tablica 4.9.). Broj bodova na Testu crtanja sata također nije bio ovisan o spolu, jer nisu pronađene značajne razlike ($U = 339,5; p = 0,14$) kod muških i ženskih ispitanika s AB, kao niti kod muških i ženskih ispitanika s MCI ($U = 288,5; p = 0,32$) (Tablice 4.8. i 4.9.).

4.4. Rezultati kognitivnih ljestvica kod ispitanika s Alzheimerovom bolesti i ispitanika s blagim kognitivnim poremećajem

4.4.1. Rezultati MMSE testa kod ispitanika s Alzheimerovom bolesti i ispitanika s blagim kognitivnim poremećajem

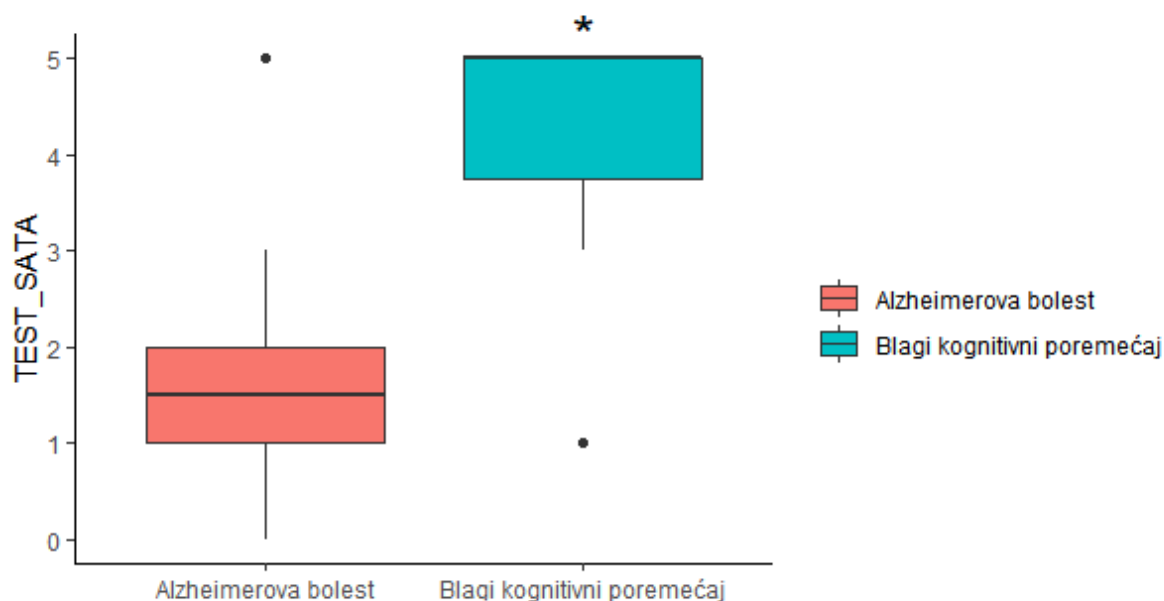
Rezultati broja bodova koji opisuju kognitivni status ispitanika, broj bodova na MMSE testu i Testu crtanja sata, prikazuju značajne razlike između ispitanika s AB i MCI (Tablica 4.8. i 4.9. i Slika 4.2.). Brojevi bodova na MMSE testu odstupali su od normalne razdiobe kod ispitanika s AB ($W = 0,79; p < 0,001$), kao i kod ispitanika s MCI ($W = 0,74; p < 0,001$). Utvrđene su značajne razlike (Mann-Whitney test) u broju bodova na MMSE testu između ispitanika s AB i MCI ($U = 92,5; p < 0,001$) jer su, očekivano, ispitanici s MCI imali značajno veći broj bodova na testu MMSE nego ispitanici s AB (Slika 4.2.).



Slika 4.2. Broj bodova na skali MMSE između ispitanika s Alzheimerovom bolešću i blagim kognitivnim poremećajem. Rezultati su prikazani kao medijan (središnja linija) i donji i gornji kvartil (od 25. do 75. percentila) (vrijednosti koje odstupaju, prikazane su kao izdvojene točke); * $p < 0,001$ prema broju bodova na skali MMSE kod ispitanika s AB (Mann-Whitney test).

4.4.2. Rezultati Testa crtanja sata kod ispitanika s Alzheimerovom bolešću i ispitanika s blagim kognitivnim poremećajem

Utvrđene su značajne razlike (Mann-Whitney test) u broju bodova na Testu crtanja sata između ispitanika s AB i MCI ($U = 120$; $p < 0,001$). Naime, prema očekivanju, ispitanici s MCI imali su značajno veći broj bodova na testu crtanja sata od bolesnika s AB (Slika 4.3.).



Slika 4.3. Broj bodova u Testu crtanja sata između ispitanika s Alzheimerovom bolesti i blagim kognitivnim poremećajem. Rezultati su prikazani kao medijan (središnja linija) i donji i gornji kvartil (od 25. do 75. percentila) (vrijednosti koje odstupaju, prikazane su kao izdvojene točke); * $p < 0,001$ prema broju bodova na skali Testa crtanja sata kod ispitanika s AB (Mann-Whitney test)

Tablica 4.10. Razlike između demografskih i kognitivnih parametara kod ispitanika s Alzheimerovom bolesti i blagim kognitivnim poremećajem

Varijabla	Statistika	p vrijednost	Veličina učinka	95 % interval pouzdanost veličine učinka
Spol	$\chi^2 = 1,45$	0,23	$\varphi_c = 0,1$	0,007 – 0,25
Dob	$U = 6063,5$	$< 0,001$	$\delta = 0,64$	0,51 – 0,78
MMSE	$U = 92,5$	$< 0,001$	$\delta = -0,98$	0,99 – -0,95
Test crtanja sata	$U = 120$	$< 0,001$	$\delta = -0,97$	-0,99 – -0,93

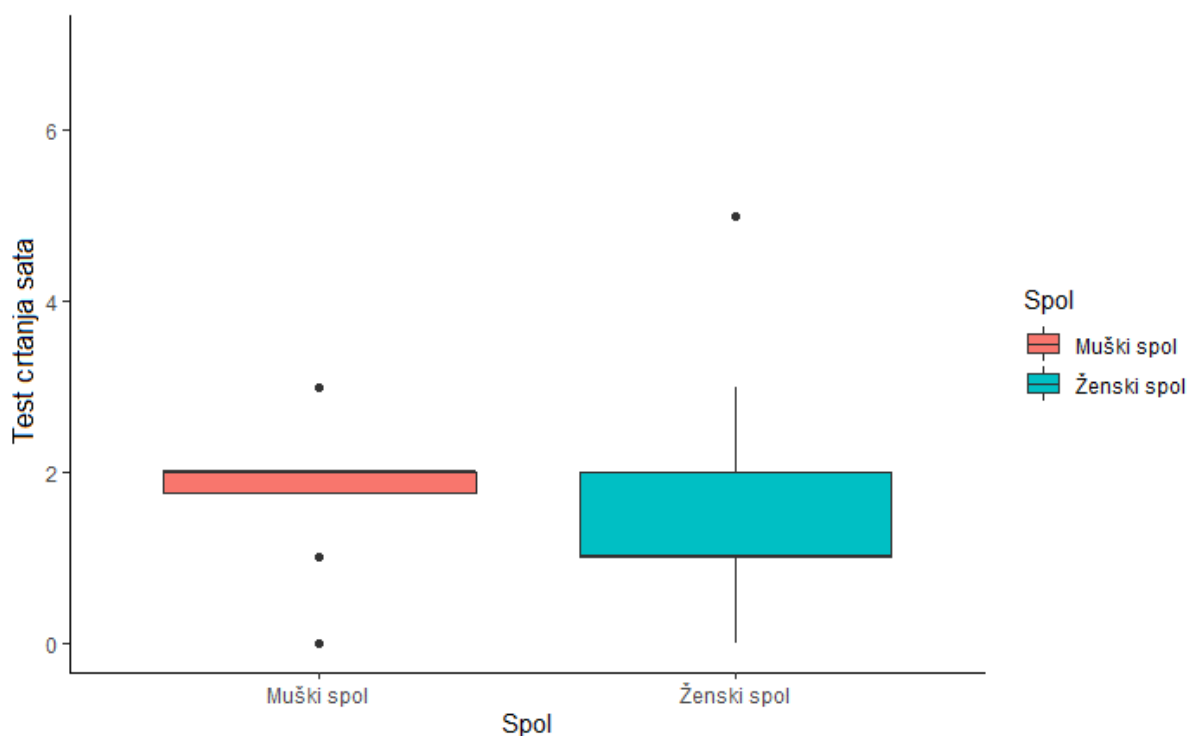
MMSE – Mini-mental skala za praćenje urušavanja kognicije.

U Tablici 4.10. prikazani su zbirno svi rezultati (frekvencije i razlike između skupina) u ispitanika s AB i MCI vezanih za spol i dob, te rezultati MMSE testa i Testa crtanja sata, p vrijednosti i veličine učinka uz njihov 95 % interval pouzdanosti. Nije bilo značajnih razlika po spolu, dok su se dob, te broj bodova na MMSE testu i Testu crtanja sata značajno razlikovali između ispitanika s AB i MCI.

4.5. Rezultati kognitivnih ljestvica između muških i ženskih ispitanika s Alzheimerovom bolešću i blagim kognitivnim poremećajem

4.5.1. Rezultati Testa crtanja sata između muških i ženskih ispitanika s Alzheimerovom bolešću

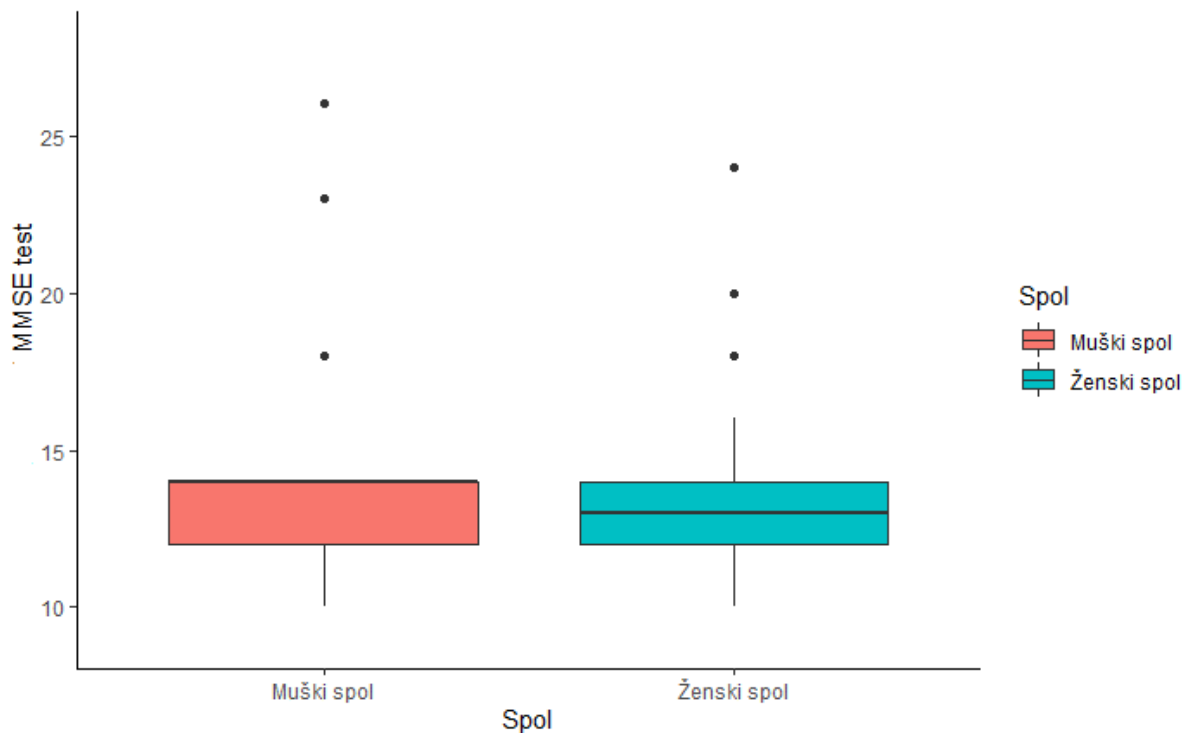
Nisu utvrđene značajne razlike (Mann-Whitney test) u broju bodova na Testu crtanja sata između ispitanika muškog spola i ispitanica ženskog spola s AB ($U = 339,5$; $p = 0,14$), (Slika 4.4.).



Slika 4.4. Broj bodova u Testu crtanja sata između muških i ženskih ispitanika s Alzheimerovom bolešću. Rezultati su prikazani kao medijan (središnja linija) i donji i gornji kvartil (od 25. do 75. percentila) (vrijednosti koje odstupaju, prikazane su kao izdvojene točke)

4.5.2. Rezultati MMSE testa između muških i ženskih ispitanika s Alzheimerovom bolešću

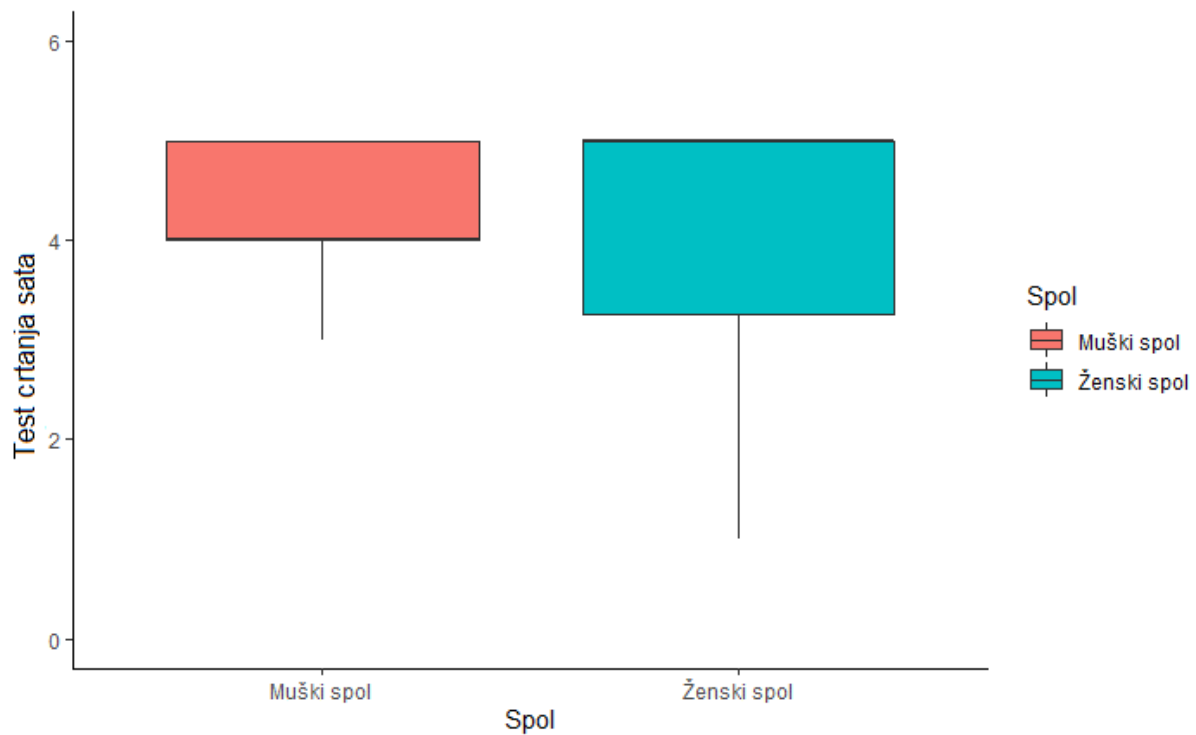
Prema Mann-Whitney testu nisu utvrđene značajne razlike u broju bodova na MMSE testu između ispitanika muškog spola i ispitanica ženskog spola s AB ($U = 718,5$; $p = 0,22$), (Slika 4.5.).



Slika 4.5. Broj bodova na MMSE testu između muških i ženskih ispitanika s Alzheimerovom bolešću. Rezultati su prikazani kao medijan (središnja linija) i donji i gornji kvartil (od 25. do 75. percentila) (vrijednosti koje odstupaju, prikazane su kao izdvojene točke)

4.5.3. Rezultati Testa crtanja sata između muških i ženskih ispitanika s blagim kognitivnim poremećajem

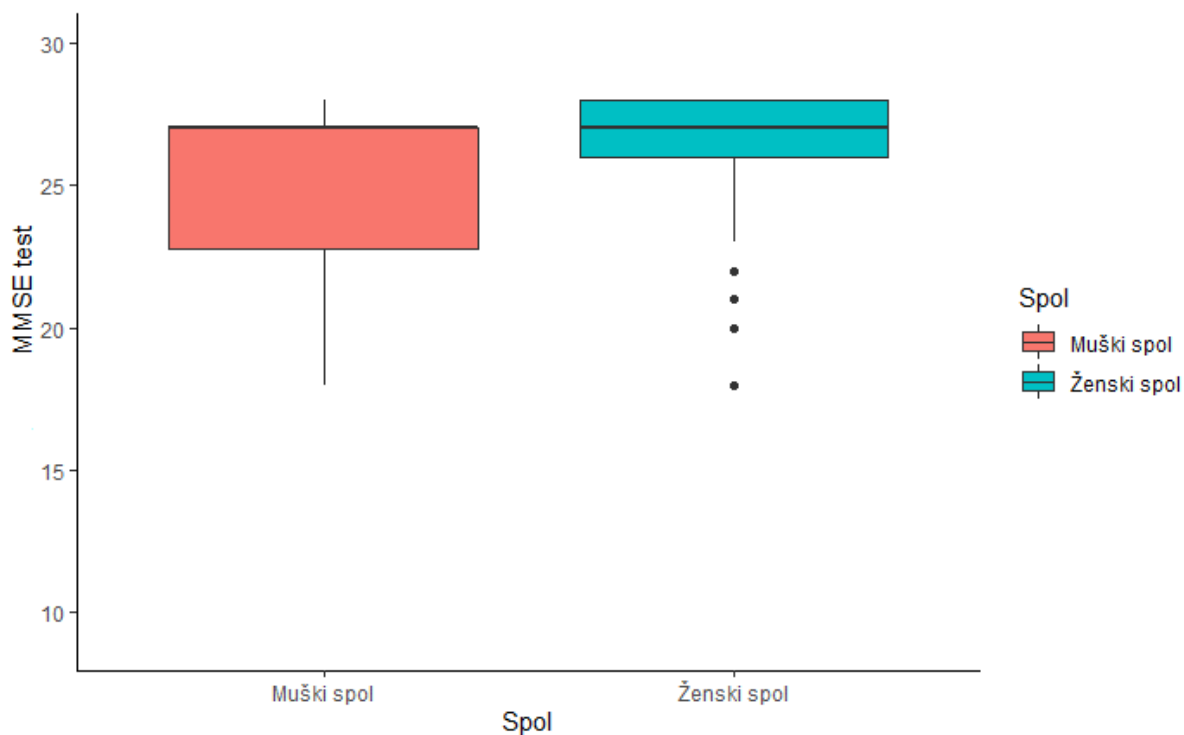
Nisu utvrđene značajne razlike (Mann-Whitney test) u broju bodova na Testu crtanja sata između muških i ženskih ispitanika s MCI ($U = 288,5; p = 0,32$).



Slika 4.6. Broj bodova u Testu crtanja sata između muških i ženskih ispitanika s blagim kognitivnim poremećajem. Rezultati su prikazani kao medijan (središnja linija) i donji i gornji kvartil (od 25. do 75. percentila).

4.5.4. Rezultati MMSE testa između muških i ženskih ispitanika s blagim kognitivnim poremećajem

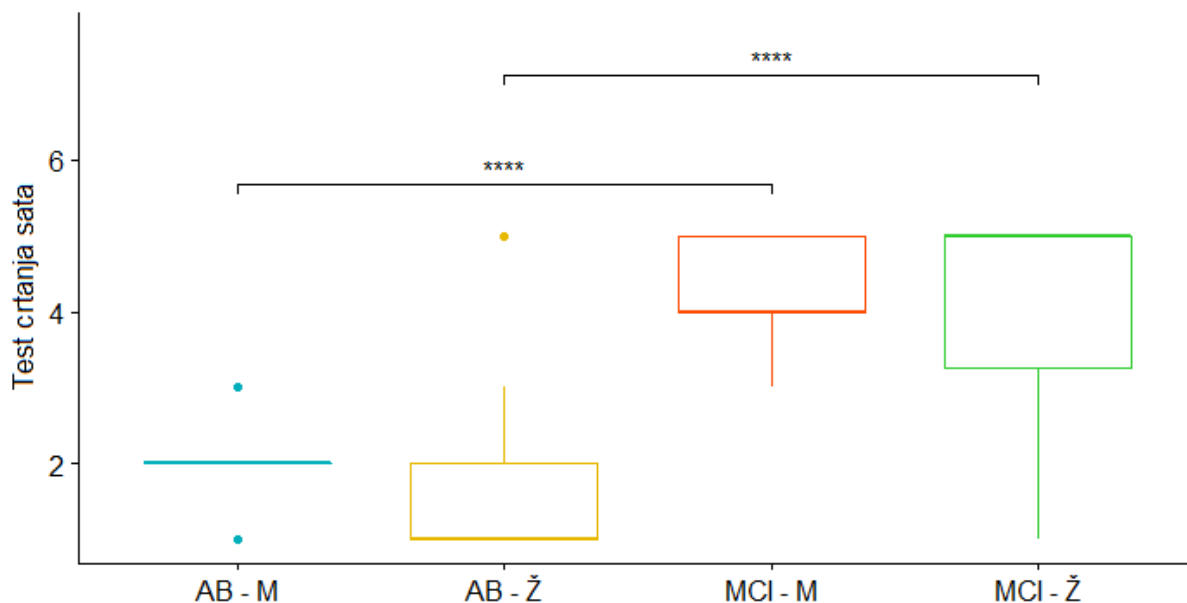
Prema Mann-Whitney testu nisu utvrđene značajne razlike u broju bodova na MMSE testu između ispitanika muškog spola i ispitanica ženskog spola s MCI ($U = 998$; $p = 0,09$), (Slika 4.7.).



Slika 4.7. Broj bodova na MMSE testu između muških i ženskih ispitanika s blagim kognitivnim poremećajem. Rezultati su prikazani kao medijan (središnja linija) i donji i gornji kvartil (od 25. do 75. percentila) (vrijednosti koje odstupaju, prikazane su kao izdvojene točke)

4.5.5. Rezultati bodova na Testu crtanja sata između muških i ženskih ispitanika s Alzheimerovom bolešću i muških i ženskih ispitanika s MCI

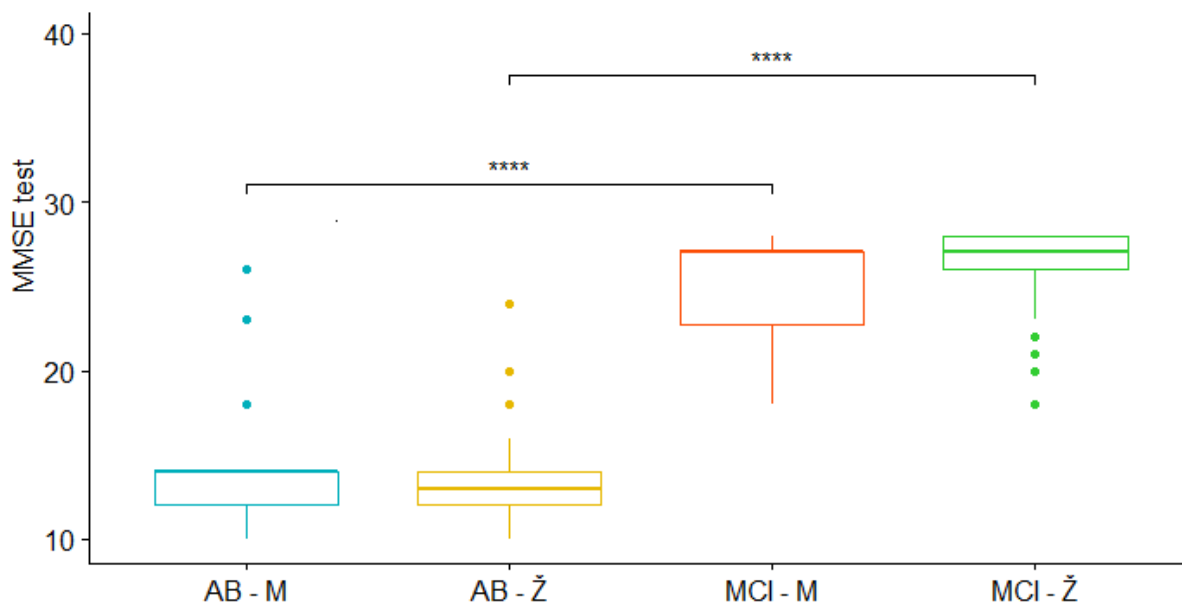
Utvrđena je značajna razlika u broju bodova Testa crtanja sata kod muških i ženskih ispitanika s AB i kod muških i ženskih ispitanika s MCI ($H = 64,13$; $p < 0,001$; Kruskal-Wallisova ANOVA). Muški ispitanici s AB imali su značajno manji broj bodova na Testu crtanja sata od muških ispitanika s MCI ($p < 0,0001$). Ženske ispitanice s AB imale su značajno manji broj bodova na Testu crtanja sata od ženskih ispitanica s MCI ($p < 0,0001$). Unutar skupine s AB nije bilo značajne razlike u broju bodova Testa crtanja sata između muških i ženskih ispitanika. Također, unutar skupine s MCI, nije bilo značajne razlike u broju bodova Testa crtanja sata između muških i ženskih ispitanika (Slika 4.8.).



Slika 4.8. Rezultati Testa crtanja sata kod ispitanika s Alzheimerovom bolesti i blagim kognitivnim poremećajem obzirom na muški i ženski spol. Rezultati su prikazani kao medijan (središnja linija) i donji i gornji kvartil (od 25. do 75. percentila); AB-M – muški ispitanici s AB; AB-Ž – ženski ispitanici s AB; MCI-M – muški ispitanici s MCI; MCI-Ž – ženski ispitanici s MCI. **** $p < 0,0001$, post-hoc Dunn test s Benjamini - Hochberg korekcijom.

4.5.6. Rezultati bodova na MMSE testu između muških i ženskih ispitanika s Alzheimerovom bolesti i muških i ženskih ispitanika s blagim kognitivnim poremećajem

Utvrđena je značajna razlika između istraživanih podskupina ($H = 123,98$; $p < 0,001$; Kruskal-Wallisova analiza). Muški ispitanici s AB imali su značajno manji broj bodova MMSE testa od muških ispitanika s MCI ($p < 0,0001$). Ženske ispitanice s AB imale su značajno manji broj bodova MMSE testa od ženskih ispitanica s MCI ($p < 0,0001$). Unutar podskupine s AB nije bilo značajne razlike u broju bodova MMSE između muških i ženskih ispitanika. Također, unutar podskupine s MCI, nije bilo značajne razlike u broju postignutih bodova MMSE testa između muških i ženskih ispitanika (Slika 4.9.).



Slika 4.9. Rezultati MMSE testa kod ispitanika s Alzheimerovom bolesti i blagim kognitivnim poremećajem obzirom na muški i ženski spol. Rezultati su prikazani kao medijan (središnja linija) i donji i gornji kvartil (od 25. do 75. percentila); AB-M – muški ispitanici s AB; AB-Ž – ženski ispitanici s AB; MCI-M – muški ispitanici s MCI; MCI-Ž - ženski ispitanici s MCI. **** $p < 0,0001$, post-hoc Dunn test s Benjamini – Hochberg korekcijom.

4.6. Koncentracija citokina IL-1 α , TNF- α i IL-10 u serumu ispitanika s Alzheimerovom bolešti i blagim kognitivnim poremećajem

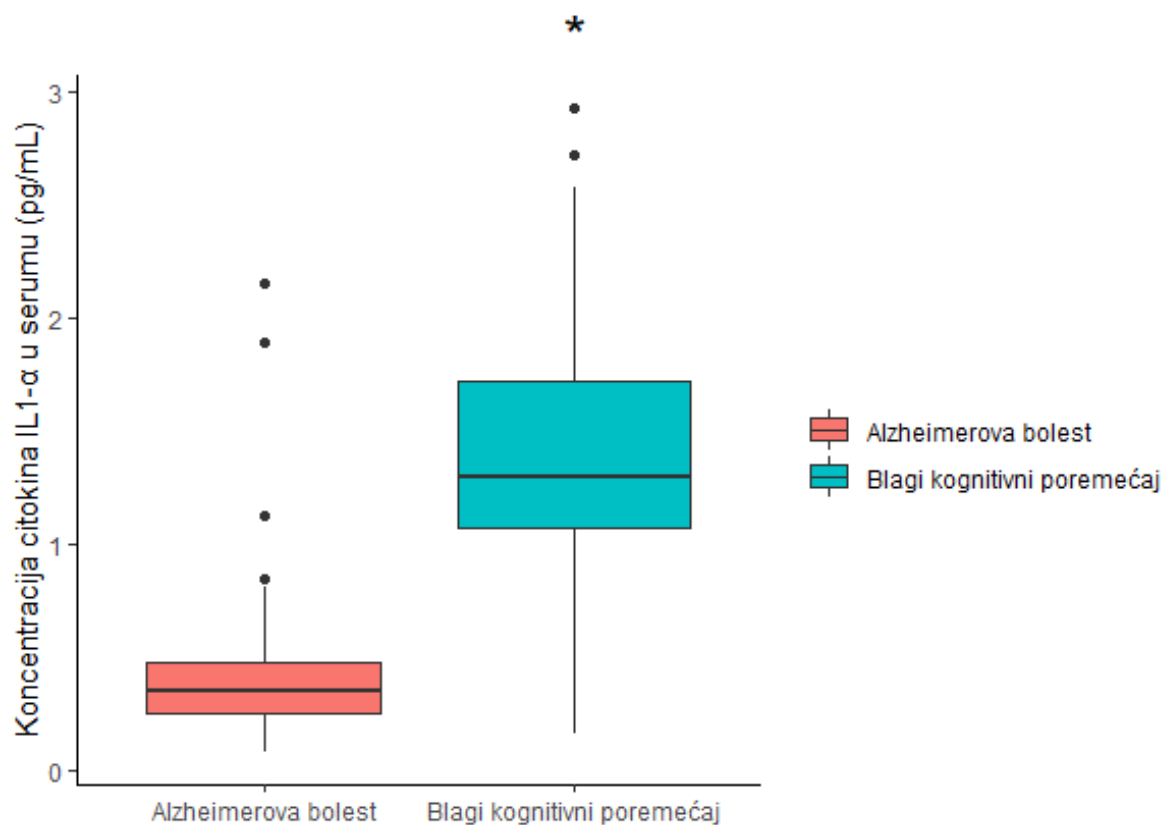
Tablica 4.11. Koncentracija citokina IL-1 α , TNF- α i IL-10 u serumu ispitanika s Alzheimerovom bolešti i blagim kognitivnim poremećajem

	Alzheimerova bolest (n = 74)	Blagi kognitivni poremećaj (n = 100)
<i>IL-1α</i>		
Medijan [Min; Max]	0,357 [0,0820; 2,15]	1,30 [0,166; 18,9]
<i>TNF-α</i>		
Medijan [Min; Max]	18,6 [3,13; 41,4]	6,49 [1,96; 48,6]
<i>IL-10</i>		
Medijan [Min; Max]	3,90 [0,170; 624]	4,09 [0,522; 71,0]

Svi rezultati su prikazani kao medijani te minimalne i maksimalne vrijednosti.

4.6.1. Koncentracija citokina IL-1 α u serumu ispitanika s Alzheimerovom bolešti i blagim kognitivnim poremećajem

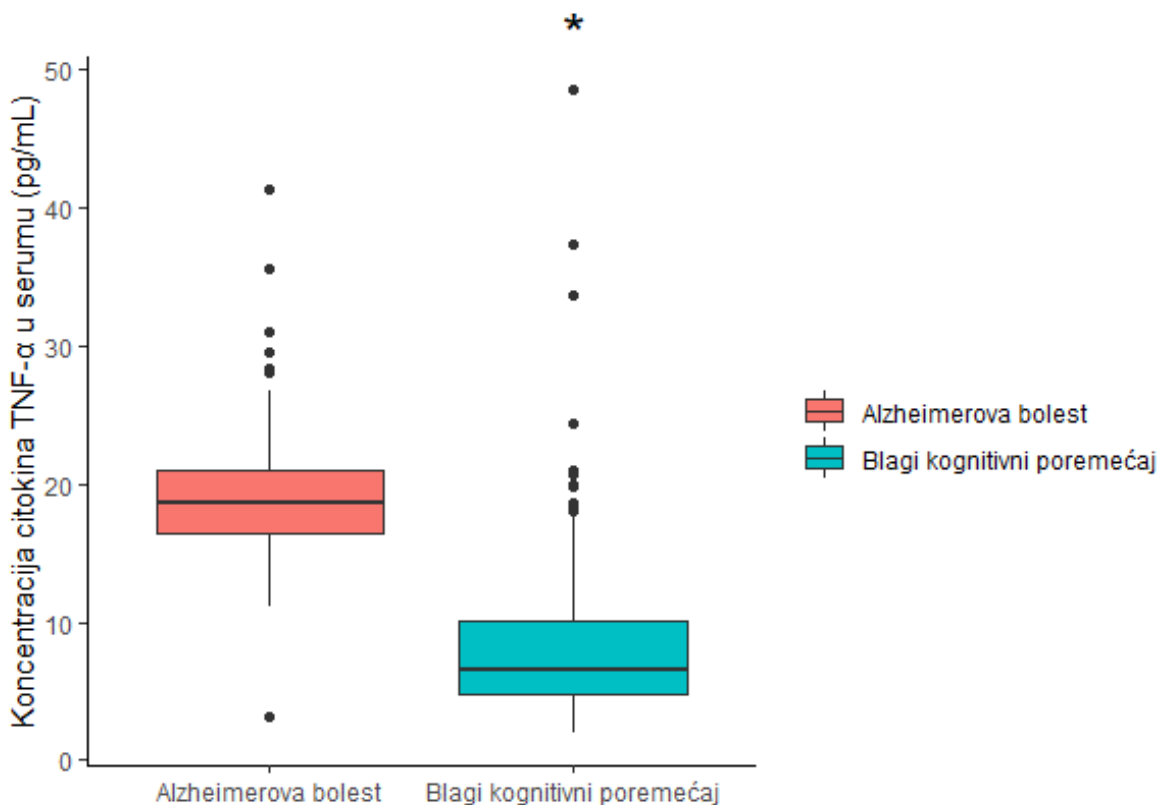
Pronađene su značajne (Mann-Whitney test) razlike u koncentraciji citokina IL-1 α u serumu između skupina s AB i MCI ($U = 464$; $p < 0,001$). Ispitanici s AB imali su značajno nižu koncentraciju IL-1 α u serumu prema ispitanicima s MCI (Slika 4.10.).



Slika 4.10. Koncentracija citokina IL-1 α u serumu ispitanika s Alzheimerovom bolesti i blagim kognitivnim poremećajem. Rezultati su prikazani kao medijan (središnja linija) i donji i gornji kvartil (od 25. do 75. percentila) (vrijednosti koje odstupaju, prikazane su kao izdvojene točke); * $p < 0,001$ prema koncentraciji IL-1 α u ispitanika s AB (Mann-Whitney test).

4.6.2. Koncentracija citokina TNF- α u serumu ispitanika s Alzheimerovom bolesti i blagim kognitivnim poremećajem

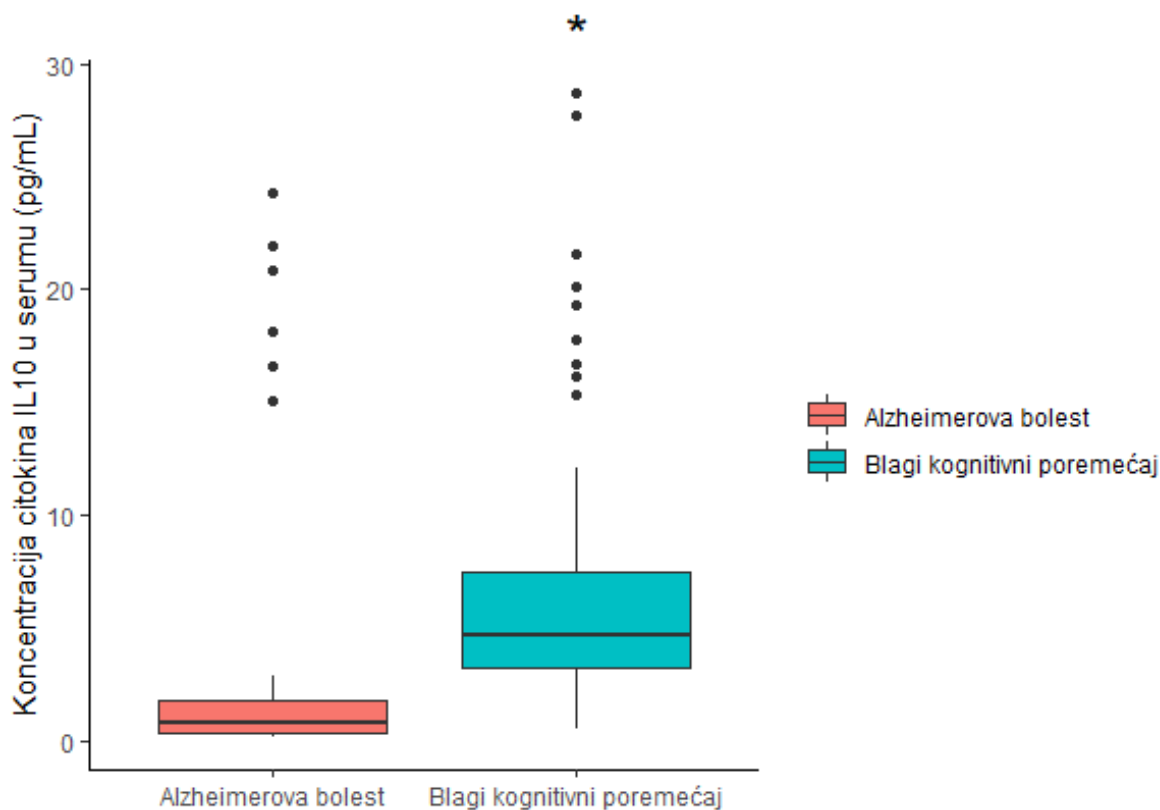
Pronađene su značajne razlike u koncentraciji citokina TNF- α u serumu između ispitanika s AB i MCI ($U = 6433,5$; $p < 0,001$; Mann-Whitney test). Ispitanici s AB imali su značajno povišenu koncentraciju TNF- α u serumu prema ispitanicima s MCI (Slika 4.11.).



Slika 4.11. Koncentracija citokina TNF- α u serumu ispitanika s Alzheimerovom bolesti i blagim kognitivnim poremećajem. Rezultati su prikazani kao medijan (središnja linija) i donji i gornji kvartil (od 25. do 75. percentila) (vrijednosti koje odstupaju, prikazane su kao izdvojene točke); * $p < 0,001$ prema koncentraciji TNF- α u ispitanika s AB (Mann-Whitney test).

4.6.3. Koncentracija citokina IL-10 u serumu ispitanika s Alzheimerovom bolesti i blagim kognitivnim poremećajem

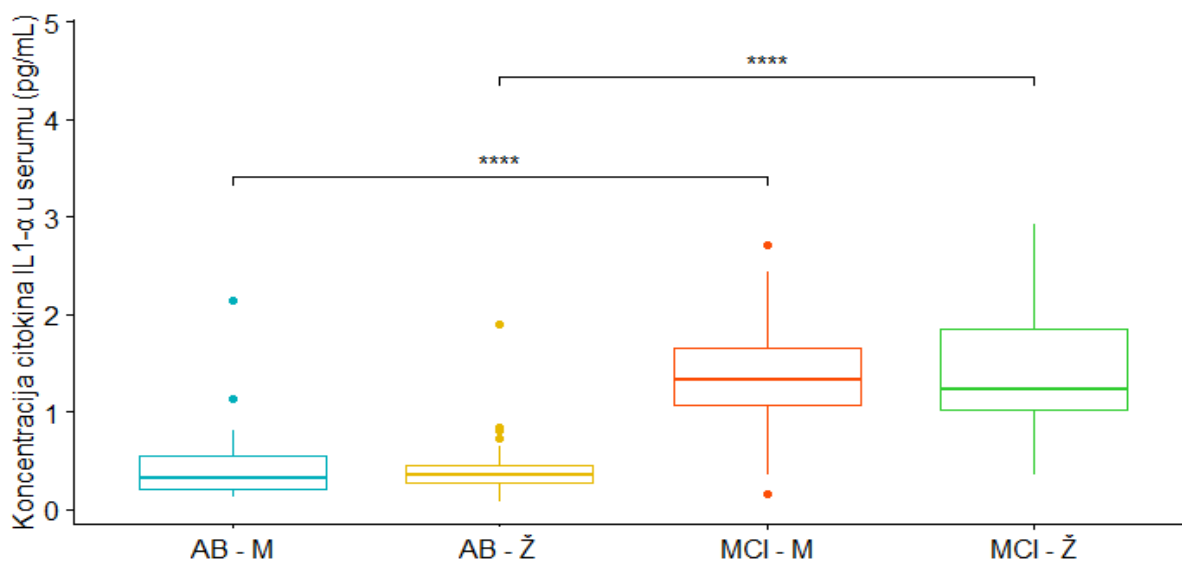
Utvrđene su značajne razlike u koncentraciji IL-10 citokina u serumu između ispitanika s AB i MCI ($U = 974$; $p < 0,001$; Mann-Whitney test). Ispitanici s AB imali su značajno nižu koncentraciju IL-10 u serumu prema ispitanicima s MCI (Slika 4.12.).



Slika 4.12. Koncentracija citokina IL-10 u serumu ispitanika s Alzheimerovom bolesti i blagim kognitivnim poremećajem. Rezultati su prikazani kao medijan (središnja linija) i donji i gornji kvartil (od 25. do 75. percentila) (vrijednosti koje odstupaju, prikazane su kao izdvojene točke); * $p < 0,001$ prema koncentraciji IL-10 kod ispitanika s AB (Mann-Whitney test).

4.6.4. Razlike u koncentraciji citokina IL-1 α u serumu između muških i ženskih ispitanika s Alzheimerovom bolesti i blagim kognitivnim poremećajem

Iako je regresijska analiza pokazala da spol ne utječe značajno na koncentracije citokina u serumu ispitanika s AB i MCI, kako bi dodatno istražili mogući utjecaj spola na koncentraciju citokina, svi su ispitanici podijeljeni po spolu. Za analizu razlika u koncentraciji citokina IL-1 α između muških i ženskih ispitanika s AB i MCI korištena je neparametrijska Kruskal-Wallisova analiza rangova jer je koncentracija IL-1 α odstupala od normalne razdiobe kod svih skupina.



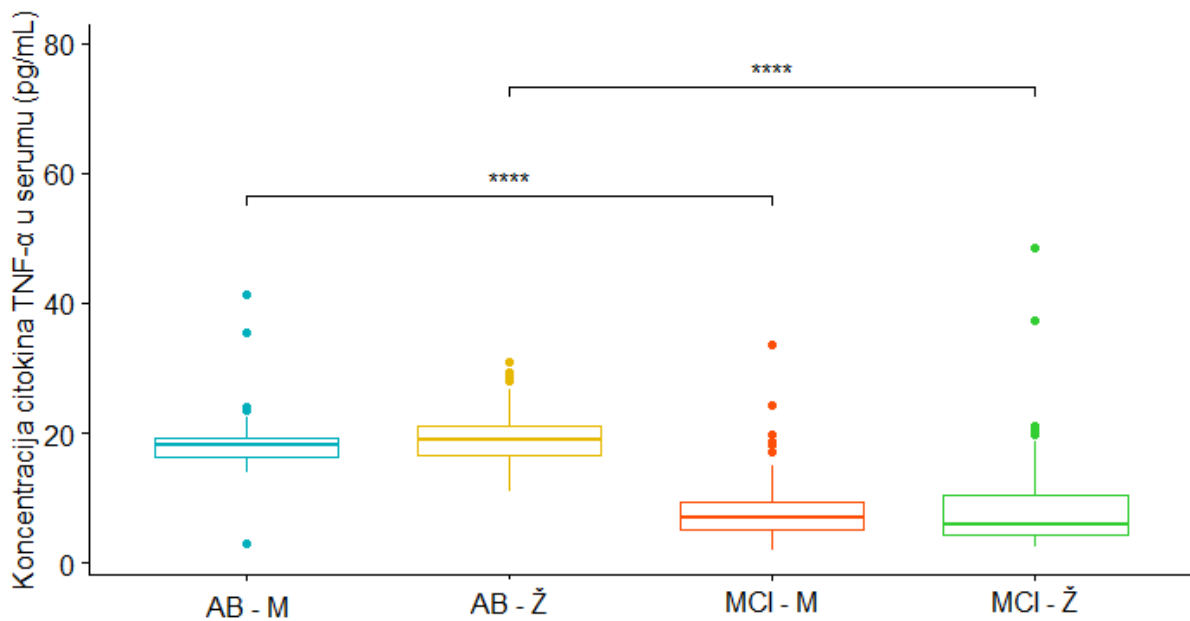
Slika 4.13. Razlike u koncentraciji citokina IL-1 α između muških i ženskih ispitanika s Alzheimerovom bolesti i muških i ženskih ispitanika s blagim kognitivnim poremećajem; AB-M – muški ispitanici s AB; AB-Ž – ženske ispitanice s AB; MCI-M – muški ispitanici s MCI; MCI-Ž – ženske ispitanice s MCI; **** $p < 0,0001$; Dunn post-hoc test s Benjamini-Hochberg korekcijom.

Pronađena je značajna razlika između muških i ženskih ispitanika s AB ili MCI ($H = 93,89$; $p < 0,001$) (Slika 4.13.). Koncentracija citokina IL-1 α nije se značajno razlikovala između muških i ženskih osoba unutar ispitanika s AB ili između muških i ženskih osoba unutar ispitanika s MCI. Ti su rezultati potvrdili rezultate regresijske analize. Međutim, koncentracija citokina IL-1 α bila je značajno ($p < 0,0001$) povišena kod muških ispitanika s MCI prema muškim ispitanicima s AB, i postojala je značajna ($p < 0,0001$) razlika u koncentraciji IL-1 α između ženskih ispitanica s MCI prema ženskim ispitanicima s AB (Slika 4.13.).

4.6.5. Razlike u koncentraciji citokina TNF- α u serumu između muških i ženskih ispitanika s Alzheimerovom bolesti i blagim kognitivnim poremećajem

Razlike između muških i ženskih ispitanika s AB i muških i ženskih ispitanika s MCI u koncentraciji TNF- α testirane su pomoću neparametrijske Kruskal-Wallisove analize rangova radi odstupanja rezultata od normalne razdiobe kod svih skupina. Utvrđene su značajne ($H = 69,72$; $p < 0,001$) razlike u koncentraciji TNF- α kod muških i ženskih ispitanika s AB i kod muških i ženskih ispitanika s MCI (Slika 4.14.). Koncentracija TNF- α nije se značajno

razlikovala između muških i ženskih ispitanika s AB ili između muških i ženskih ispitanika s MCI i time su potvrđeni i rezultati regresijske analize. Međutim, koncentracija TNF- α bila je značajno ($p < 0,0001$; Dunn post hoc test s Benjamini-Hochberg korekcijom) snižena kod muških ispitanika s MCI prema muškim ispitanicima s AB, i bila je značajno ($p < 0,0001$; Dunn post hoc test s Benjamini-Hochberg korekcijom) snižena kod ženskih ispitanica s MCI prema ženskim ispitanicima s AB (Slika 4.14.).

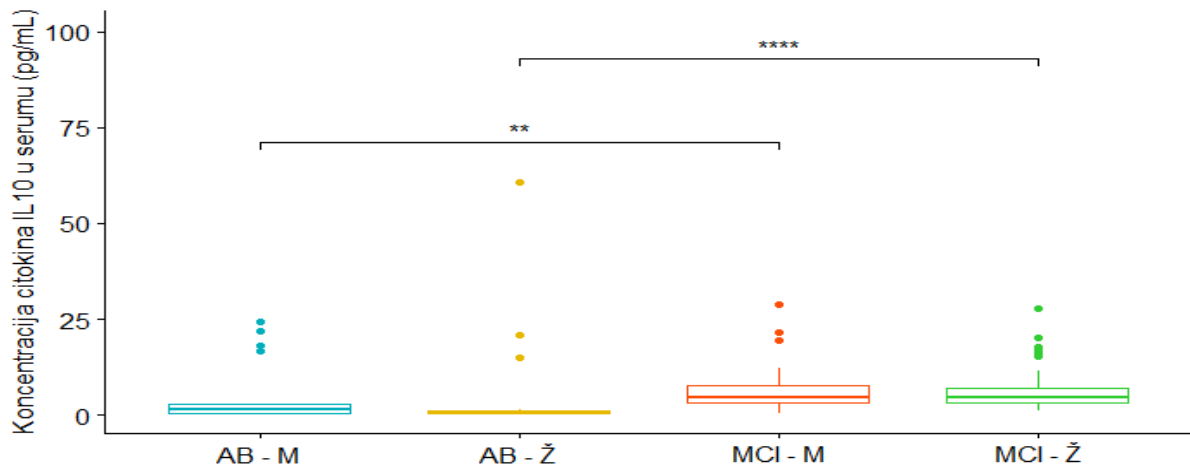


Slika 4.14. Razlike u koncentraciji citokina TNF- α između muških i ženskih ispitanika s Alzheimerovom bolešću i muških i ženskih ispitanika s blagim kognitivnim poremećajem; AB-M – muški ispitanici s AB; AB-Ž – ženske ispitanice s AB; MCI-M – muški ispitanici s MCI; MCI-Ž – ženske ispitanice s MCI; **** $p < 0,0001$; Dunn post-hoc test s Benjamini-Hochberg korekcijom.

4.6.6. Razlike u koncentraciji citokina IL-10 u serumu između muških i ženskih ispitanika s Alzheimerovom bolešću i blagim kognitivnim poremećajem

Za analizu razlika u koncentraciji IL-10 između muških i ženskih ispitanika s AB i MCI korištena je neparametrijska Kruskal-Wallisova analiza rangova jer je koncentracija IL-10 odstupala od normalne razdiobe. Pokazana je značajna razlika u koncentraciji citokina IL-10 između muških i ženskih ispitanika s AB i muških i ženskih ispitanika s MCI ($H = 21,53$; $p < 0,001$), (Slika 4.15.). Kao što je regresijska analiza utvrdila, koncentracija citokina IL-10

nije se značajno razlikovala između spolova. Naime, nije bilo značajnih razlika u koncentraciji citokina IL-10 između muških i ženskih ispitanika s AB ili između muških i ženskih ispitanika s MCI. Međutim, koncentracija citokina IL-10 bila je značajno povišena kod muških ispitanika s MCI prema muškim ispitanicima s AB ($p < 0,01$), kao i kod ženskih ispitanica s MCI prema ženskim ispitanicima s AB ($p < 0,0001$), (Slika 4.15.).



Slika 4.15. Razlike u koncentraciji citokina IL-10 između muških i ženskih ispitanika s Alzheimerovom bolesti i muških i ženskih ispitanika s blagim kognitivnim poremećajem; AB-M – muški ispitanici s AB; AB-Ž – ženske ispitanice s AB; MCI-M – muški ispitanici s MCI; MCI-Ž – ženske ispitanice s MCI; ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$; Dunn post-hoc test s Benjamini-Hochberg korekcijom.

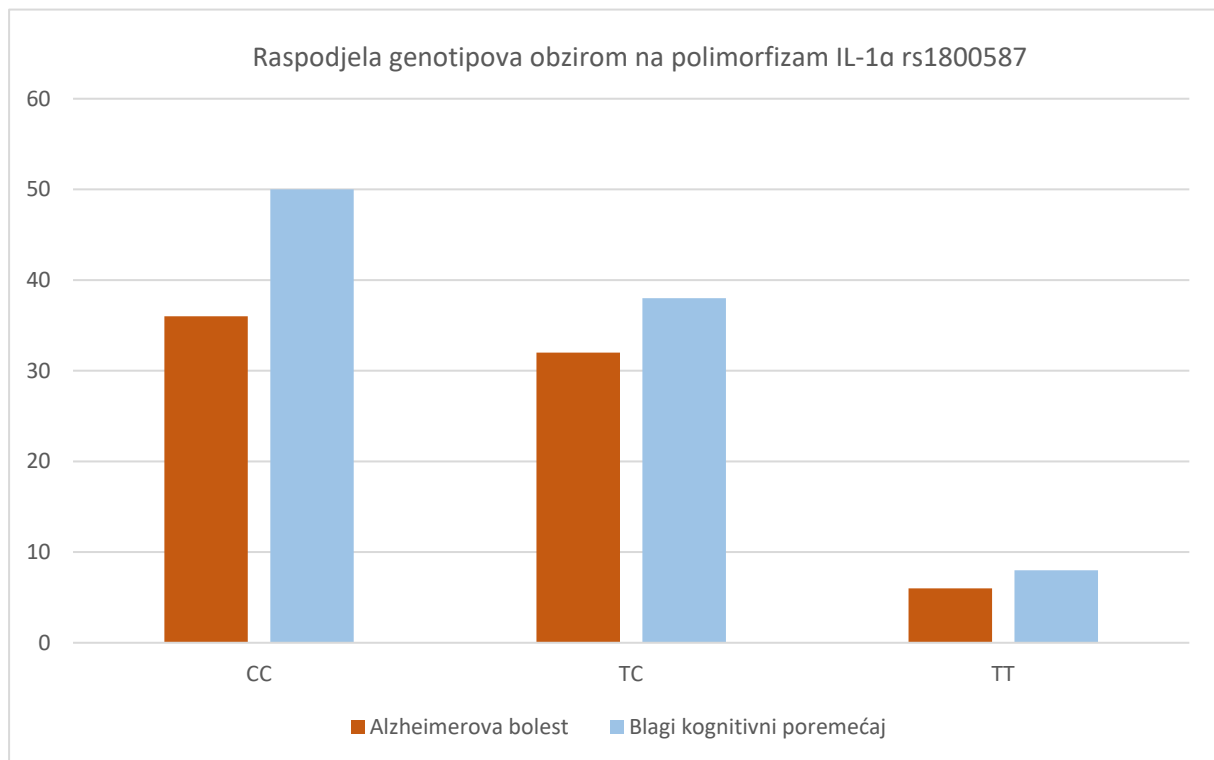
4.7. Razlike u frekvencijama genotipova i alela između ispitanika s Alzheimerovom bolešću i blagim kognitivnim poremećajem

Tablica 4.12. Frekvencije genotipova obzirom na polimorfizam TNF- α rs1800629, polimorfizam IL-1 α rs1800587 i polimorfizam IL-10 rs1800896 u ispitanika s Alzheimerovom bolešću i blagim kognitivnim poremećajem

	Alzheimerova bolest (n = 74)	Blagi kognitivni poremećaj (n = 100)
<i>IL-1α rs1800587</i>		
TC	32 (43,2 %)	38 (38,0 %)
CC	36 (48,6 %)	50 (50,0 %)
TT	6 (8,1 %)	8 (8,0 %)
<i>TNF-α rs1800629</i>		
GG	55 (74,3 %)	75 (75,0 %)
A nosioci	19 (25,7 %)	22 (22,0 %)
<i>IL-10 rs1800896</i>		
AA	17 (23,0 %)	33 (33,0 %)
GG	23 (31,1 %)	32 (32,0 %)
GA	34 (45,9 %)	32 (32,0 %)

U Tablici 4.12. su prikazane frekvencije genotipova obzirom na IL-1 α rs1800587, TNF- α rs1800629 i IL-10 rs1800896 polimorfizme u ispitanika s AB i MCI. Kod TNF- α rs1800629 frekvencije su prikazane kao A nosioci (kombinirani AA i GA genotipovi) i GG homozigoti, jer je samog AA homozigotnog genotipa bilo jako malo. Rezultati su prikazani u brojevima i postotcima.

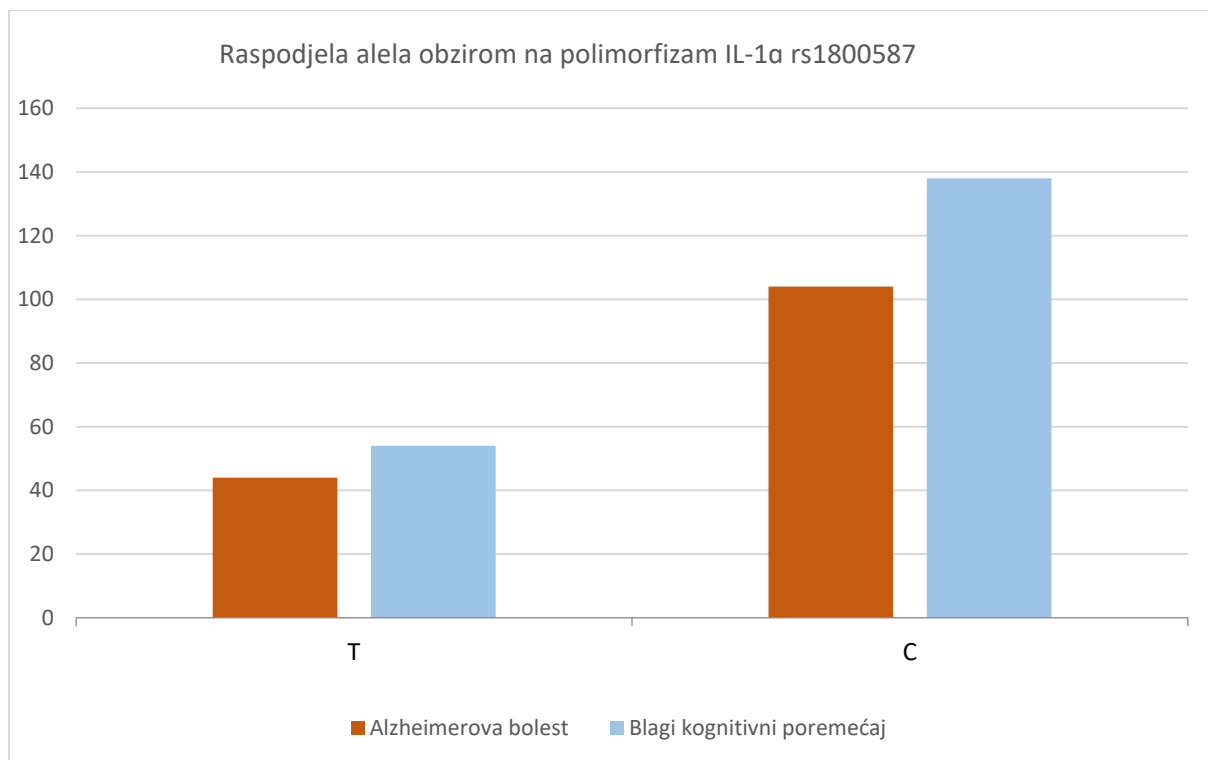
4.7.1. Razlike u distribuciji genotipova i alela obzirom na polimorfizam IL-1 α rs1800587



Slika 4.16. Raspodjela genotipova TC, CC i TT obzirom na polimorfizam IL-1 α rs1800587 između skupina ispitanika s Alzheimerovom bolesti i blagim kognitivnim poremećajem. Rezultati su prikazani numerički.

Utvrđeno je da nema odstupanja od HWE obzirom na IL-1 α rs1800587 genotipove ($\chi^2 = 0,26$; $p = 0,61$). Nisu pokazane značajne razlike u distribuciji genotipova CC, TC i TT između ispitanika s AB i MCI ($\chi^2 = 0,24$; $p = 0,89$), (Slika 4.16.).

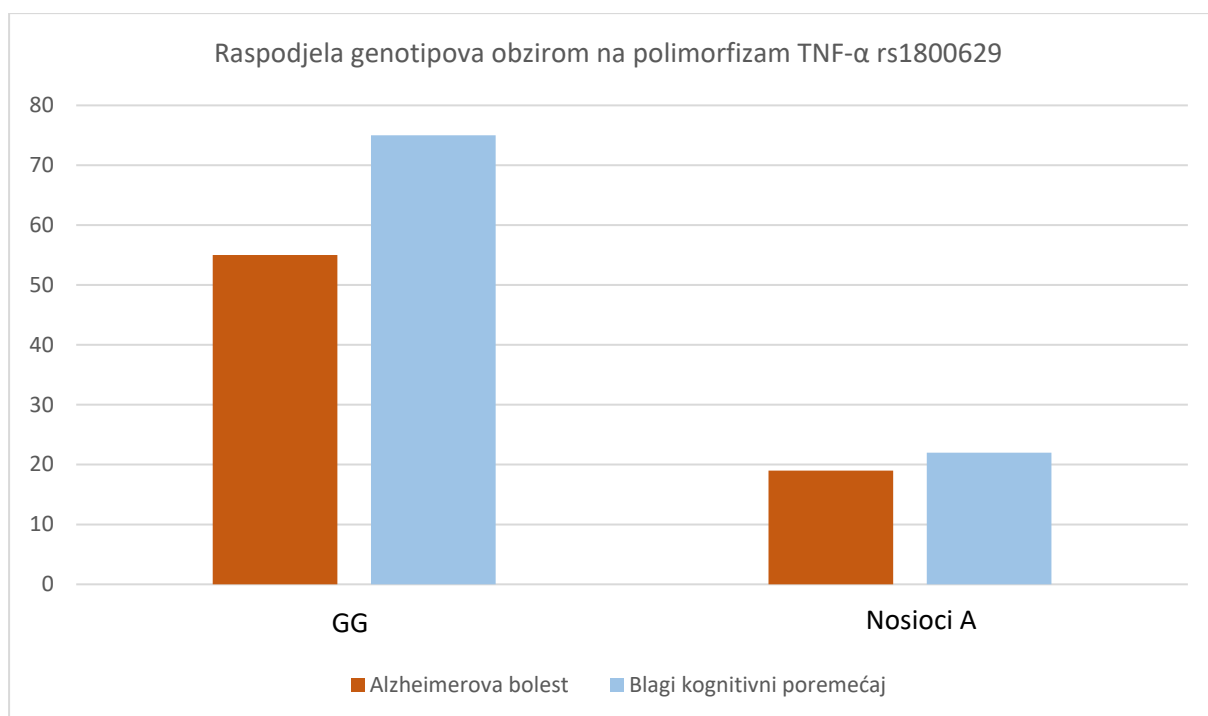
Sukladno tim nalazima, nije utvrđena značajna razlika u distribuciji alela T i alela C između ispitanika s AB i MCI ($\chi^2 = 0,02$; $p = 0,84$), (Slika 4.17.).



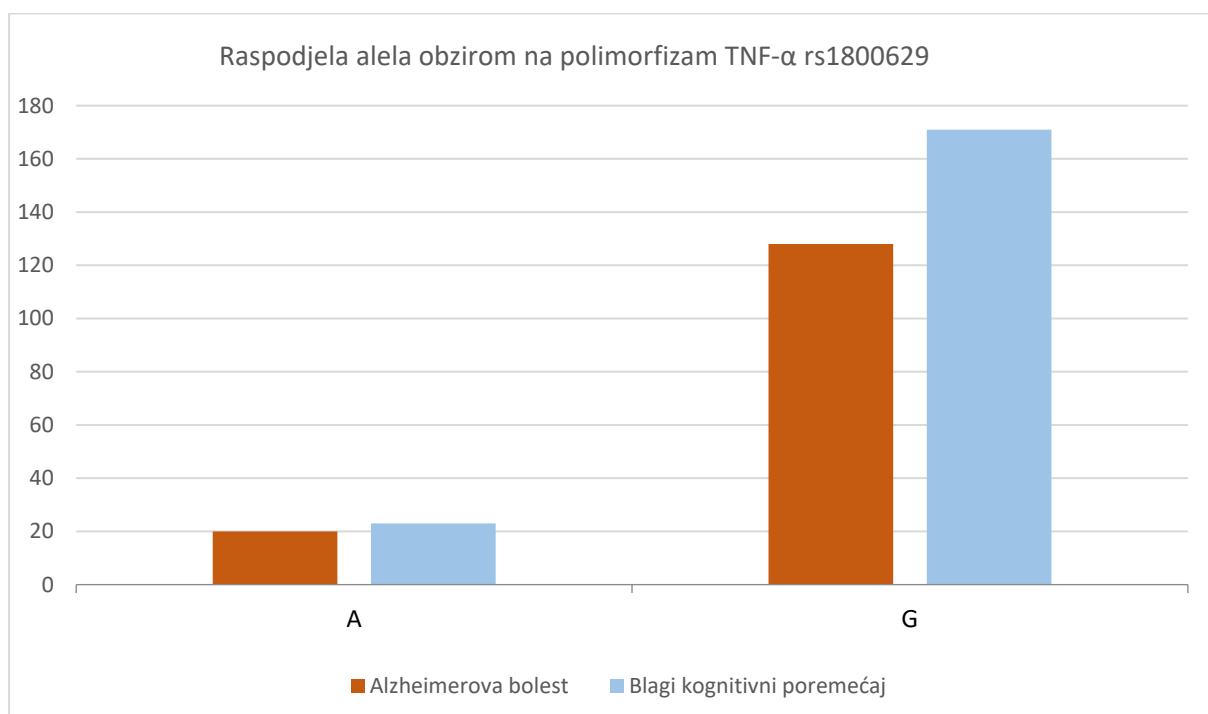
Slika 4.17. Raspodjela alela obzirom na IL-1 α rs1800587 između skupina ispitanika s Alzheimerovom bolešću i blagim kognitivnim poremećajem. Rezultati su prikazani numerički.

4.7.2. Razlike u distribuciji genotipova i alela obzirom na polimorfizam TNF- α rs1800629

Utvrđeno je da nema ($\chi^2 = 0,77; p = 0,38$) odstupanja od Hardy-Weinbergove ravnoteže (HWE) obzirom na polimorfizam TNF- α rs1800629. Nije pronađena značajna razlika u distribuciji genotipa GG prema A nosiocima (nosioci kombiniranog AA i AG genotipa) između ispitanika s AB i MCI ($\chi^2 = 0,07; p = 0,78$), (Slika 4.18.).



Slika 4.18. Raspodjela genotipova obzirom na polimorfizam TNF- α rs1800629 između ispitanika s Alzheimerovom bolesti i blagim kognitivnim poremećajem. Rezultati su prikazani numerički.

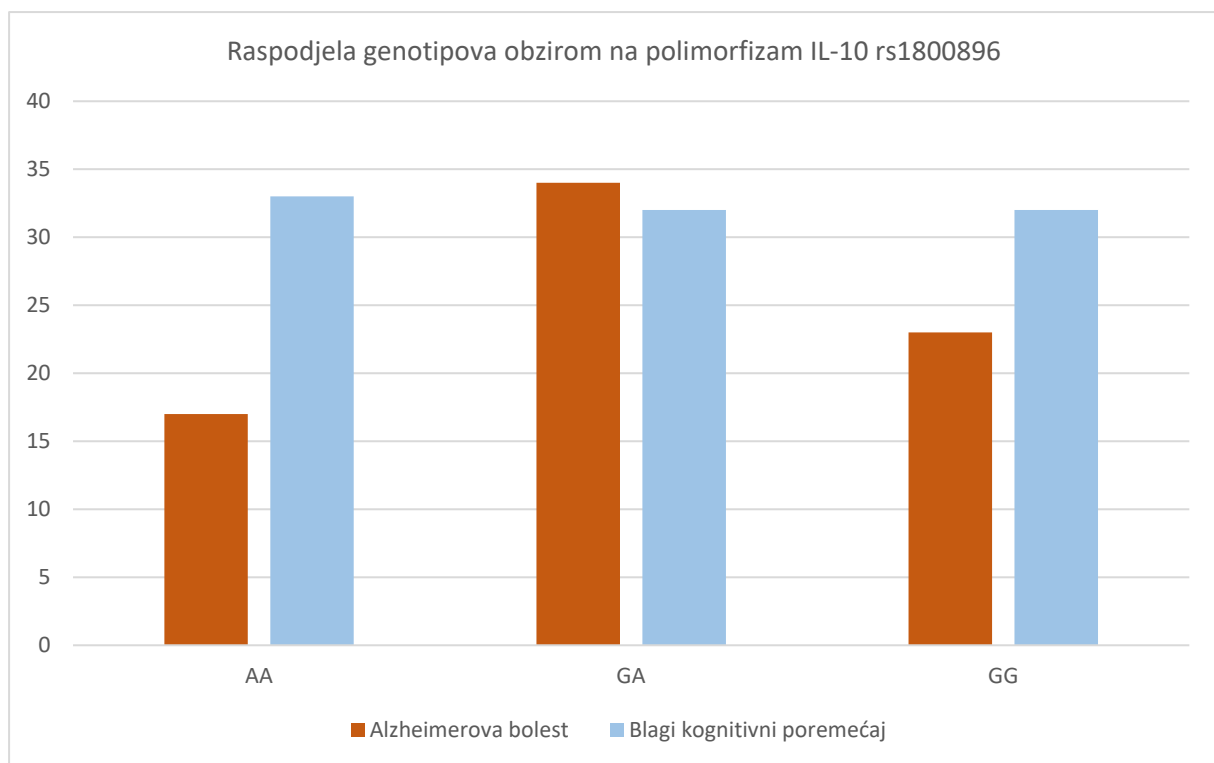


Slika 4.19. Raspodjela alela obzirom na polimorfizam TNF- α rs1800629 između skupina ispitanika s Alzheimerovom bolesti i blagim kognitivnim poremećajem. Rezultati su prikazani numerički.

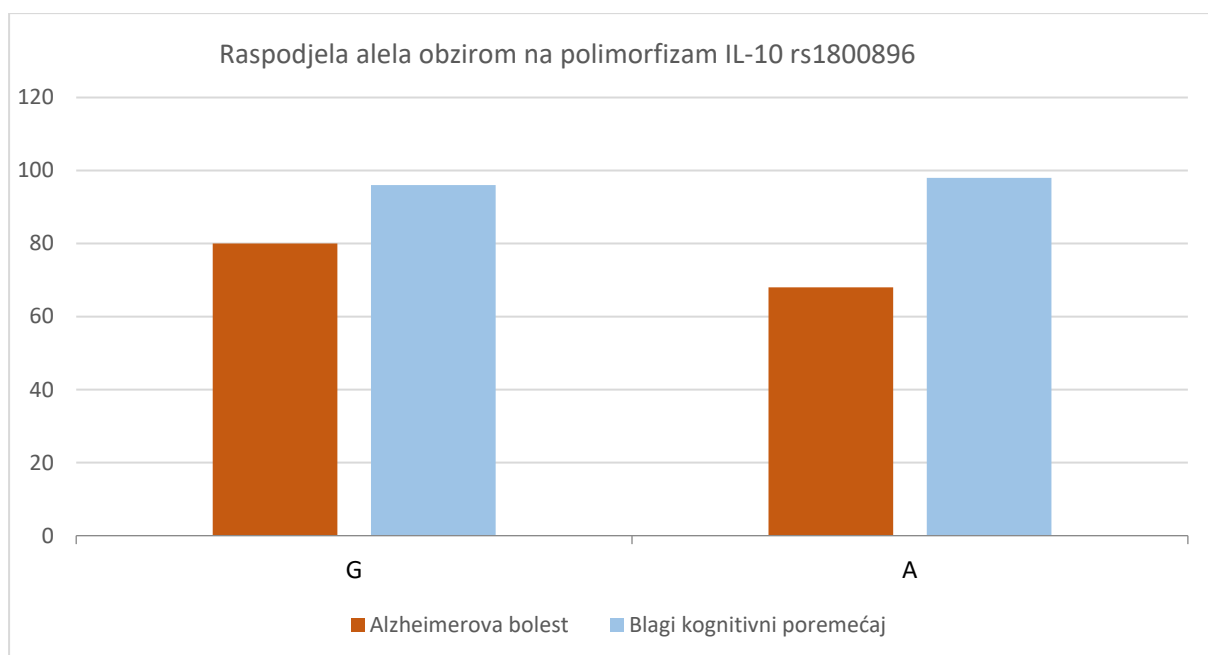
Sukladno nedostatku bilo kakvih značajnih razlika u distribuciji GG genotipa i nosioca A, nije bilo značajnih razlika u frekvencijama alela A i alela G između ispitanika s AB i MCI obzirom na polimorfizam TNF- α rs1800629 ($\chi^2 = 0,09$; $p = 0,77$), (Slika 4.19.).

4.7.3. Razlike u distribuciji genotipova i alela obzirom na polimorfizam IL-10 rs1800896

Distribucija AA, GG i GA genotipova obzirom na polimorfizam IL-10 rs1800896 značajno je odstupala od HWE ($\chi^2 = 16,82$; $p < 0,001$). Međutim, pokazano je da ne postoji značajna razlika u frekvenciji genotipova AA, GG i GA između ispitanika s AB i MCI ($\chi^2 = 3,63$; $p = 0,16$) (Slika 4.20.)



Slika 4.20. Raspodjela genotipova obzirom na polimorfizam IL-10 rs1800896 između skupina ispitanika s Alzheimerovom bolešću i blagim kognitivnim poremećajem. Rezultati su prikazani numerički.



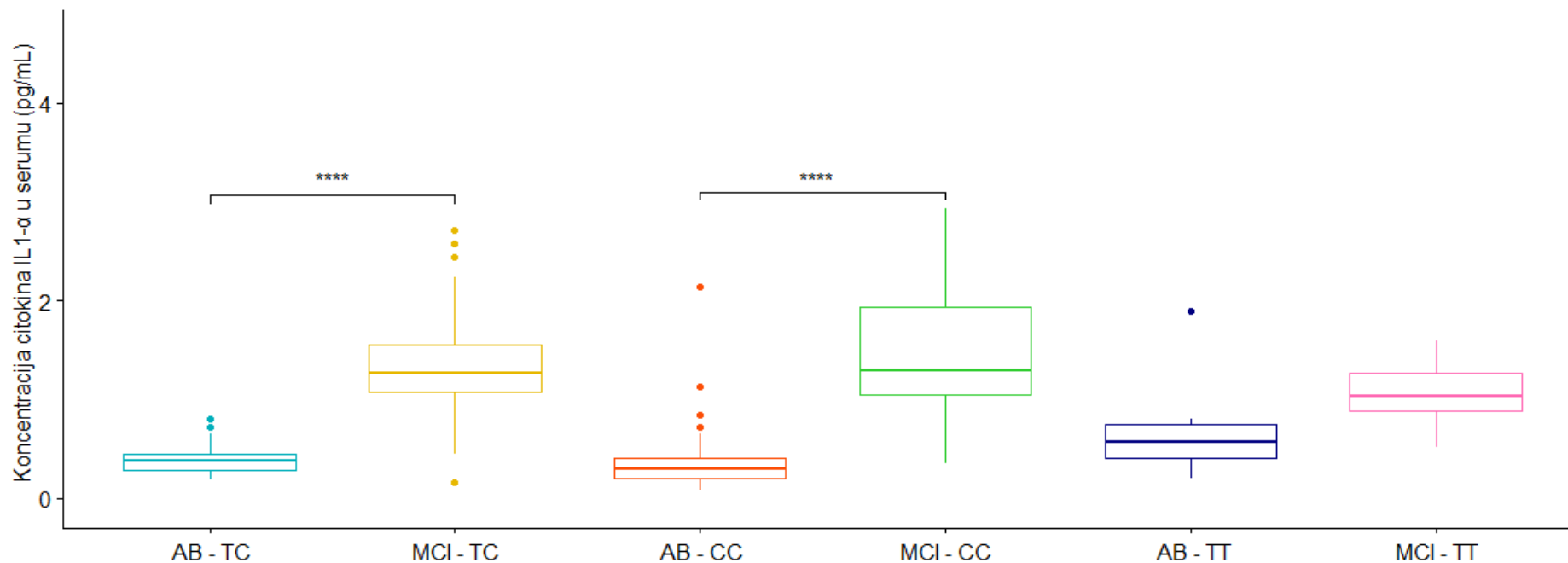
Slika 4.21. Raspodjela alela obzirom na IL-10 rs1800896 između skupina ispitanika s Alzheimerovom bolešću i blagim kognitivnim poremećajem. Rezultati su prikazani numerički.

Usklađeno s prethodnim rezultatima, nije pronađena značajna razlika u frekvencijama alela G i alela A između ispitanika s AB i MCI obzirom na polimorfizam IL-10 rs1800896 ($\chi^2 = 0,53$; $p = 0,47$) (Slika 4.21.).

4.8. Razlike u koncentraciji citokina IL-1 α , TNF-A i IL-10 u serumu obzirom na genotip i dijagnozu

4.8.1. Razlike u koncentraciji citokina IL-1 α u serumu ispitanika s Alzheimerovom bolešću i blagim kognitivnim poremećajem, obzirom na genotip IL-1 α rs1800587

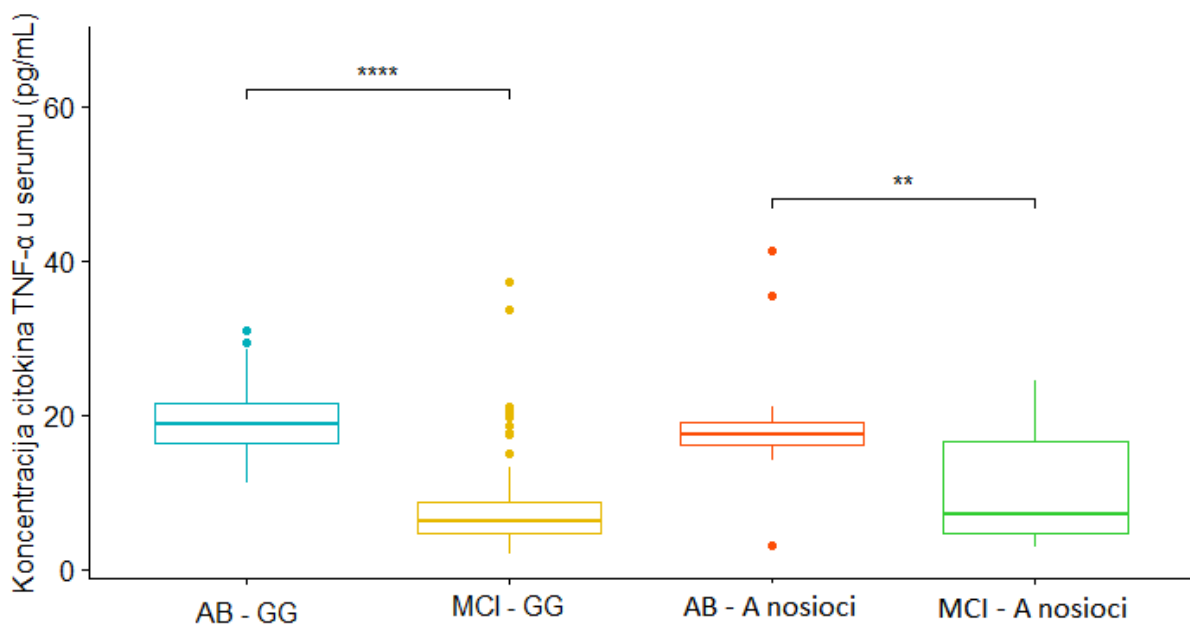
Razlike u koncentraciji citokina IL-1 α obzirom na genotipove TC, CC i TT IL-1 α rs1800587 kod ispitanika s AB i MCI analizirane su pomoću Kruskal-Wallisove analize rangova. Dunnov test nakon Benjamini-Hochberg korekcije je pokazao da unutar ispitanika s AB, ili unutar ispitanika s MCI, nije bilo značajnih razlika u koncentraciji IL-1 α u serumu kada su ispitanici podijeljeni na nosioce CC, CT ili TT genotipova obzirom na IL-1 α rs1800587. Utvrđena je samo značajna razlika u koncentraciji IL-1 α u serumu obzirom na genotipove IL-1 α rs1800587 kod ispitanika s AB i MCI ($H = 97,5$; $p < 0,001$; Kruskal-Wallisova analiza) (Slika 4.22.). Nosioci TC genotipa s MCI imali su značajno ($p < 0,0001$) veće koncentracije IL-1 α u serumu nego TC nosioci s AB. Nosioci CC genotipa s obzirom na IL-1 α rs1800587 s MCI imali su značajno ($p < 0,0001$) veće koncentracije IL-1 α u serumu nego CC nosioci s AB (Slika 4.22.).



Slika 4.22. Koncentracija IL-1 α u serumu ispitanika s Alzheimerovom bolesti i blagim kognitivnim poremećajem podijeljenih na nosioce CC,CT i TT genotipova obzirom na IL-1 α rs1800587. Rezultati su prikazani kao medijan (središnja linija) i donji i gornji kvartil (od 25. do 75. percentila); AB-TC – ispitanici s AB s TC genotipom; MCI-TC - ispitanici s MCI s TC genotipom; AB-CC - ispitanici s AB s CC genotipom; MCI-CC - ispitanici s MCI s CC genotipom; AB-TT - ispitanici s AB s TT genotipom; MCI-TT - ispitanici s MCI s TT genotipom. ****
 $p < 0,0001$, post-hoc Dunn test s Benjamini-Hochberg korekcijom.

4.8.2. Razlike u koncentraciji citokina TNF- α u serumu ispitanika s Alzheimerovom bolesti i blagim kognitivnim poremećajem obzirom na genotip TNF- α rs1800629

Kako bi analizirali moguće razlike u koncentraciji citokina TNF- α obzirom na genotipove TNF- α rs1800629 u serumu ispitanika s AB i MCI koristili smo neparametrijsku Kruskal-Wallisova analiza rangova jer je raspodjela koncentracije TNF- α odstupala od normalne. Utvrđeno je da postoje značajne razlike u koncentraciji TNF- α između GG i A nosioca obzirom na TNF- α rs1800629 kod ispitanika s AB i MCI ($H = 72,09$; $p < 0,001$) (Slika 4.23.), ali su te razlike bile vezane za dijagnozu, a ne genotip.



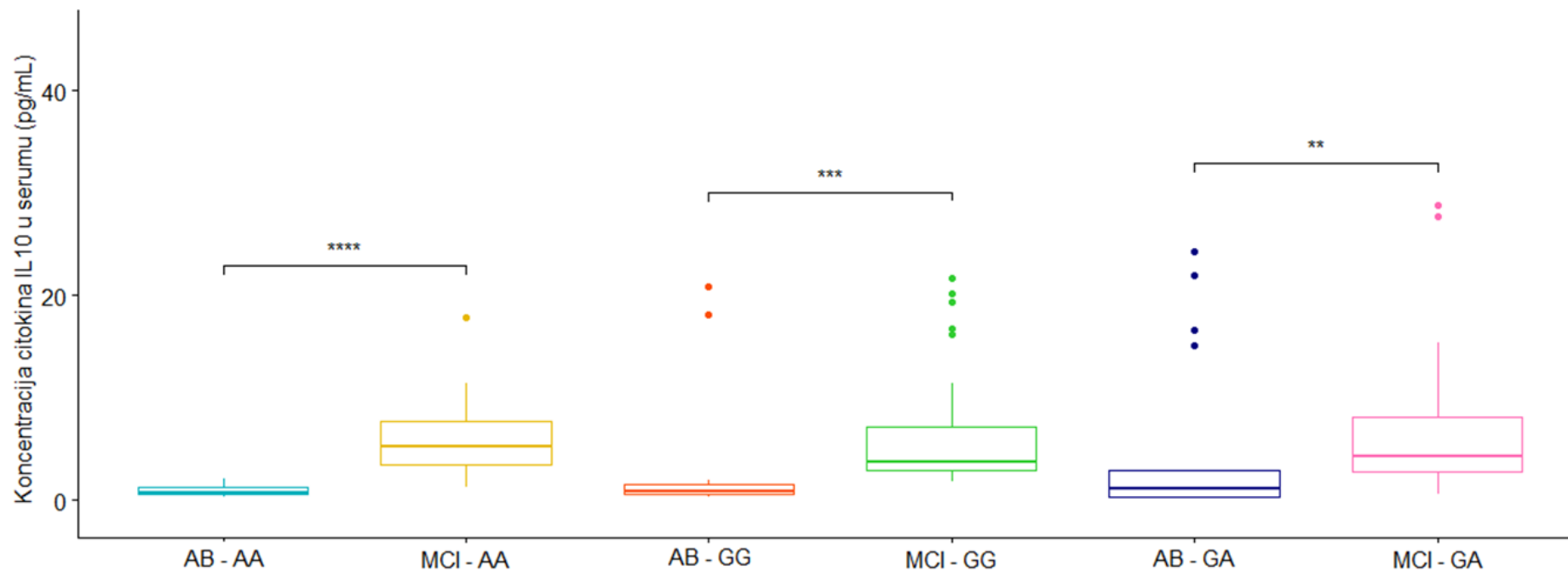
Slika 4.23. Koncentracija TNF- α u ispitanika s Alzheimerovom bolesti i blagim kognitivnim poremećajem, podijeljenih na nosioce GG genotipa prema nosiocima A obzirom na TNF- α rs1800629. Rezultati su prikazani kao medijan (središnja linija) i donji i gornji kvartil (od 25. do 75. percentila); AB-GG – ispitanici s AB s GG genotipom; MCI-GG – ispitanici s MCI s GG genotipom; AB-A nosioci – ispitanici s AB, A nosioci; MCI-A nosioci – ispitanici s MCI, A nosioci obzirom na TNF- α rs1800629; ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$ (post-hoc Dunn test s Benjamini-Hochberg korekcijom).

Nije bilo značajnih razlika u koncentraciji TNF- α kod nosioca GG vs. nosioca A u ispitanika s AB. Također, koncentracija TNF- α nije se razlikovala između nosioca GG vs. nosioca A u ispitanika s MCI (Slika 4.23.). Pronađene su značajne razlike (Slika 4.23.) u koncentraciji

TNF- α kod ispitanika, nosioca GG genotipa obzirom na TNF- α rs1800629 između ispitanika s AB i MCI ($p < 0,0001$); kao i kod A nosioca obzirom na TNF- α rs1800629 između ispitanika s AB i MCI ($p < 0,01$). Naime, koncentracija TNF- α bila je značajno viša u nosioca GG genotipa obzirom na TNF- α rs1800629 kod bolesnika s AB prema koncentraciji TNF- α kod nosioca GG u ispitanika s MCI ($p < 0,0001$). A nosioci obzirom na TNF- α rs1800629 u ispitanika s AB imali su značajno višu koncentraciju TNF- α nego A nosioci s MCI ($p < 0,01$).

4.8.3. Razlike u koncentraciji citokina IL-10 u serumu ispitanika s Alzheimerovom bolesti i blagim kognitivnim poremećajem podijeljenih prema AA, GA ili GG genotipu obzirom na polimorfizam IL-10 rs1800896

Razlike u koncentraciji citokina IL-10 obzirom na genotip AA, GA i GG IL-10 rs1800896 kod ispitanika s AB i MCI izračunate su Kruskal-Wallisovom analizom rangova. Nisu utvrđene značajne razlike u koncentraciji IL-10 u serumu ispitanika s AB podijeljenih u nosioce AA, GA ili GG genotipa obzirom na IL-10 rs1800896 (Slika 4.24.). Također nije bilo značajnih razlika u koncentraciji IL-10 u serumu ispitanika s MCI podijeljenih u nosioce AA, GA ili GG genotipa obzirom na IL-10 rs1800896 (Slika 4.24.). Dakle ti su rezultati uputili da se koncentracija IL-10 ne razlikuje između nosioca AA, GA ili GG genotipa obzirom na IL-10 rs1800896. Ono što je utvrđeno je potvrda prijašnjih rezultata, i to je Kruskal-Wallisova analiza pokazala značajnu razliku u koncentraciji IL-10 u serumu kod ispitanika s AB i MCI podijeljenih prema genotipovima obzirom na IL-10 rs1800896 ($H = 24,5; p < 0,001$), samo u odnosu na dijagnoze. Naime, ispitanici s MCI koji su bili nosioci AA genotipa, imali su značajno više ($p < 0,0001$) koncentracije IL-10 u serumu prema ispitanicima s AB, nosiocima AA genotipa. Ispitanici s MCI, nosioci GG genotipa, imali su značajno više ($p < 0,001$) koncentracije IL-10 u serumu prema ispitanicima s AB, nosiocima GG genotipa. Kod nosioca GA genotipa, ispitanici s MCI su imali značajno više ($p < 0,01$) koncentracije IL-10 u serumu prema ispitanicima s AB, nosiocima istog GA genotipa (Slika 4.24.).

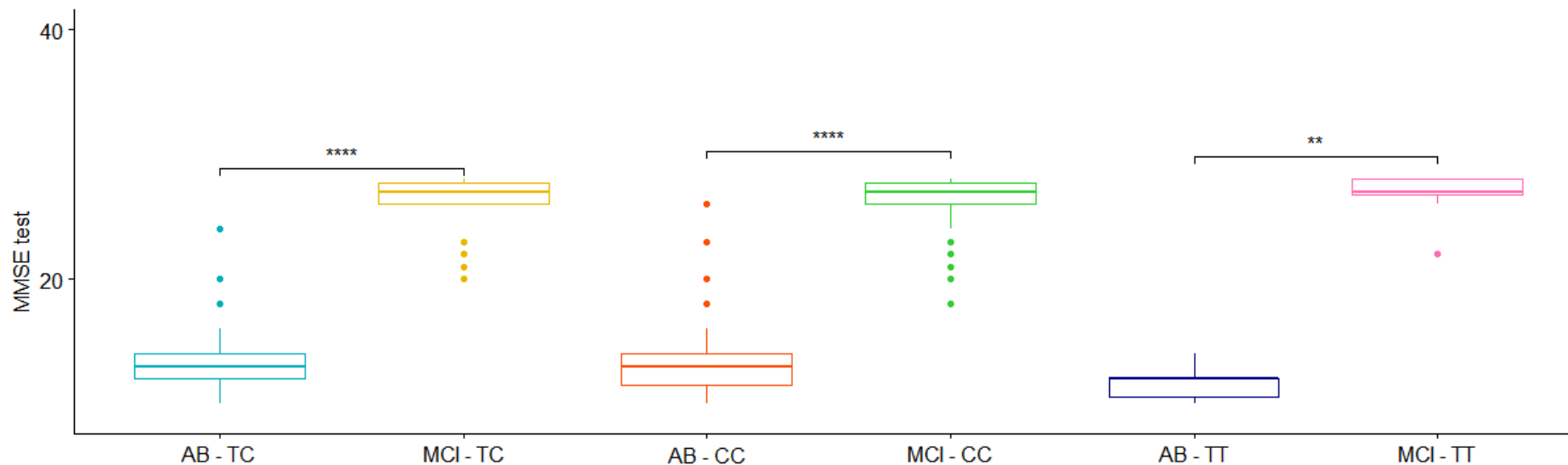


Slika 4.24. Koncentracija IL-10 kod ispitanika s Alzheimerovom bolesti i blagim kognitivnim poremećajem podijeljenih prema genotipovima obzirom na IL-10 rs1800896. Rezultati su prikazani kao medijan (središnja linija) i donji i gornji kvartil (od 25. do 75. percentila); ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; AB-AA - ispitanici s AB s AA genotipom; MCI-AA - ispitanici s MCI s AA genotipom; AB-GG - ispitanici s AB s GG genotipom; MCI-GG - ispitanici s MCI s GG genotipom; AB-GA - ispitanici s AB s GA genotipom; MCI-GA - ispitanici s MCI s GA genotipom. **** $p < 0,0001$, post-hoc Dunn test s Benjamini-Hochberg korekcijom.

4.9. Razlike u broju bodova postignutih na MMSE testu obzirom na genotip kod ispitanika s Alzheimerovom bolesti i ispitanika s blagim kognitivnim poremećajem

4.9.1. Razlike u broju bodova postignutih na MMSE testu obzirom na IL-1 α rs1800587 kod ispitanika s Alzheimerovom bolesti i ispitanika s blagim kognitivnim poremećajem

Kako bi testirali razlike u broju bodova postignutih na MMSE testu obzirom na IL-1 α rs1800587 kod ispitanika s AB i MCI, korištena je Kruskal-Wallisova ANOVA radi odstupanja od normalne razdiobe podataka. Pronađene su značajne razlike između istraživanih podskupina ($H = 121,54; p < 0,001$), (Slika 4.25.).

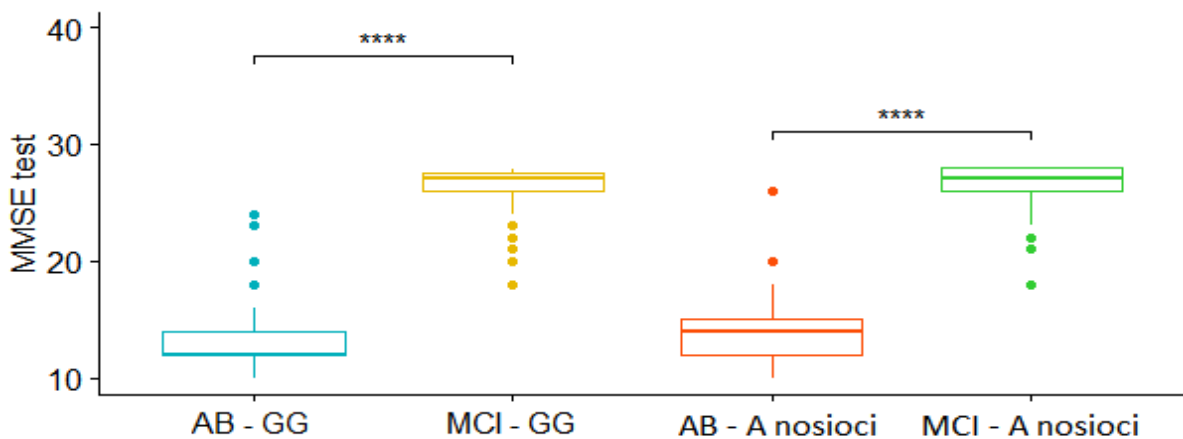


Slika 4.25. Rezultati MMSE testa kod ispitanika s Alzheimerovom bolesti i blagim kognitivnm poremećajem podijeljenih prema genotipovima obzirom na IL-1 α rs1800587. Rezultati su prikazani kao medijan (središnja linija) i donji i gornji kvartil (od 25. do 75. percentila); ** $p < 0,01$; AB-TC - ispitanici s AB s TC genotipom; MCI-TC - ispitanici s MCI s TC genotipom; AB-CC - ispitanici s AB s CC genotipom; MCI-CC - ispitanici s MCI s CC genotipom; AB-TT - ispitanici s AB s TT genotipom; MCI-TT - ispitanici s MCI s TT genotipom. **** $p < 0,0001$, post-hoc Dunn test s Benjamini-Hochberg korekcijom

Utvrđeno je da nema značajnih razlika u broju bodova postignutih na MMSE testu između ispitanika s AB, nosioca TC, CC ili TT genotipova obzirom na IL-1 α rs1800587. Također, nisu utvrđene značajne razlike u broju bodova na MMSE testu između ispitanika s MCI nosioca TC, CC ili TT genotipova. Međutim, pokazano je da postoje, očekivano, značajne ($p < 0,0001$) razlike u broju bodova na MMSE testu, između ispitanika s AB, nosioca TC genotipa i ispitanika s MCI, nosioca TC genotipa. Nadalje, postoje značajne razlike ($p < 0,0001$) između ispitanika s AB nosioca CC genotipa i ispitanika s MCI, nosioca CC genotipa. Također postoje značajne razlike ($p < 0,01$) između ispitanika s AB nosioca TT genotipa i ispitanika s MCI, nosioca TT genotipa (Slika 4.25.).

4.9.2. Razlike u broju bodova postignutih na MMSE testu obzirom na TNF- α rs1800629 kod ispitanika s Alzheimerovom bolesti i ispitanika s blagim kognitivnim poremećajem

Kako bi testirali razlike u broju bodova postignutih na MMSE testu obzirom na TNF- α rs1800629 kod ispitanika s AB i MCI, korištena je Kruskal-Wallisova ANOVA radi odstupanja od normalne razdiobe. Utvrđena je značajna razlika u broju bodova postignutih na MMSE testu obzirom na TNF- α rs1800629 kod ispitanika s AB i MCI ($H = 122,19$; $p < 0,001$), (Slika 4.26.).

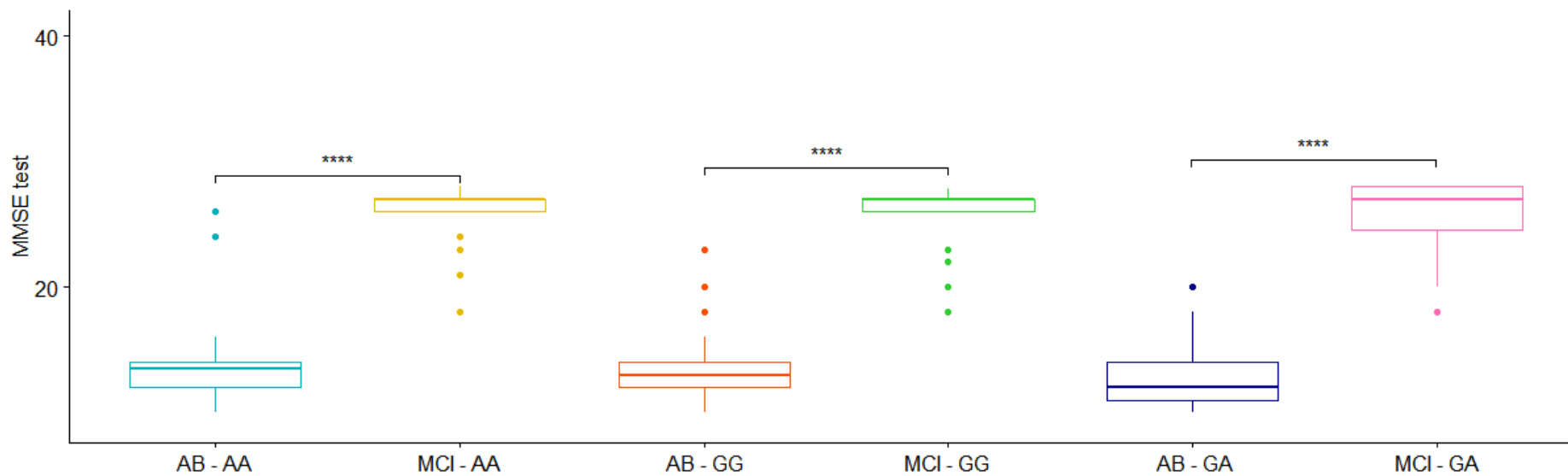


Slika 4.26. Rezultati MMSE testa kod ispitanika s Alzheimerovom bolesti i blagim kognitivnim poremećajem podijeljenih prema genotipovima obzirom na TNF- α rs1800629. Rezultati su prikazani kao medijan (središnja linija) i donji i gornji kvartil (od 25. do 75. percentila); AB-GG-ispitanici s AB s GG genotipom; MCI-GG-ispitanici s MCI s GG genotipom; AB-A nosioci-ispitanici s AB, A nosioci; MCI-A nosioci-ispitanici s MCI-A nosioci. **** $p < 0,0001$, post-hoc Dunn test s Benjamini-Hochberg korekcijom.

Utvrđeno je da nema značajnih razlika u broju bodova na MMSE testu između ispitanika s AB, nosioca GG genotipa prema A nosiocima obzirom na TNF- α rs1800629. Također, nisu utvrđene značajne razlike u broju bodova na MMSE testu između ispitanika s MCI koji su bili nosioci GG genotipa prema A nosiocima (Slika 4.26.). Međutim, pokazano je da postoje, očekivano, značajne razlike u broju bodova na MMSE testu, između ispitanika s AB, nosioca GG genotipa i ispitanika s MCI, nosioca GG genotipa ($p < 0,0001$). Također su utvrđene značajne ($p < 0,0001$) razlike u broju bodova postignutih na MMSE testu, između ispitanika s AB, nosioca A i ispitanika s MCI, nosioca A (Slika 4.26.).

4.9.3. Razlike u broju bodova postignutih na MMSE testu obzirom na IL-10 rs1800896 kod ispitanika s Alzheimerovom bolesti i ispitanika s blagim kognitivnim poremećajem

Kako bi testirali razlike u broju bodova postignutih na MMSE testu obzirom na IL-10 rs1800896 kod ispitanika s AB i MCI, korišten je neparametrijski Kruskal-Wallis test. Potvrđene su značajne razlike između broj bodova postignutih na MMSE testu obzirom na IL-10 rs1800896 kod ispitanika s AB i ispitanika s MCI ($H = 121,93$; $p < 0,001$), (Slika 4.27.), ali one su bile vezane za dijagnozu a ne za genotip.



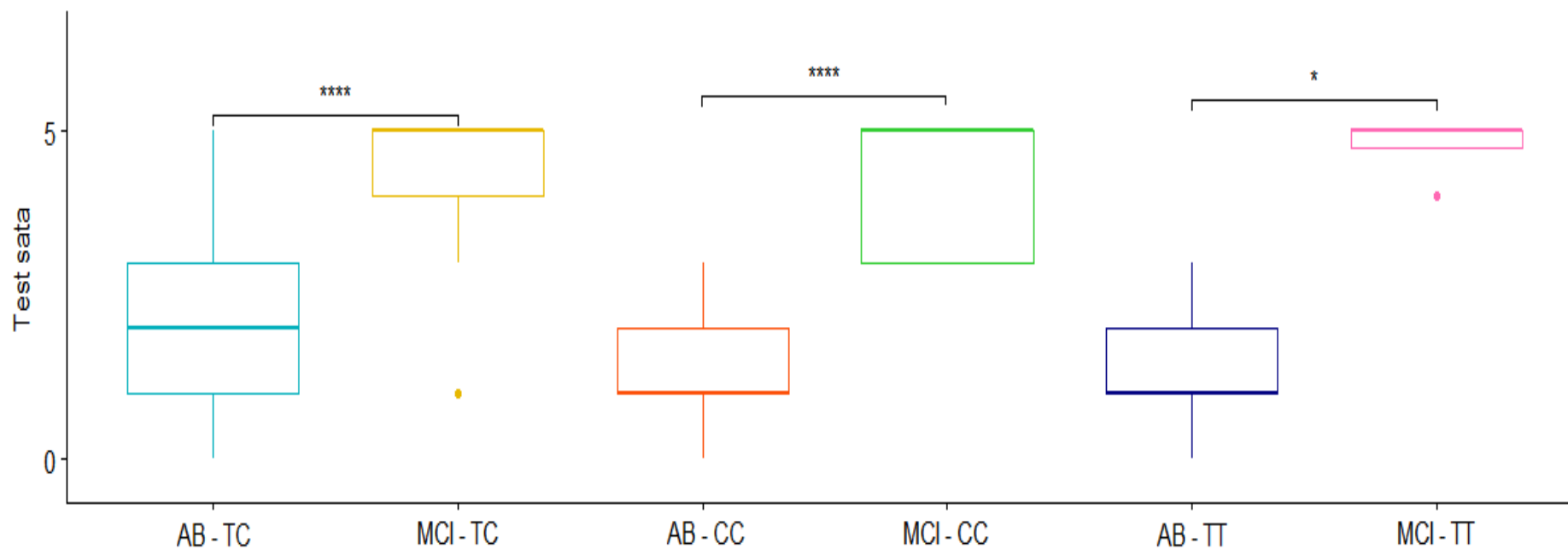
Slika 4.27. Rezultati MMSE testa kod ispitanika s Alzheimerovom bolesti i blagim kognitivnim poremećajem podijeljenih prema genotipovima obzirom na IL-10 rs1800896. Rezultati su prikazani kao medijan (središnja linija) i donji i gornji kvartil (od 25. do 75. percentila); AB-AA - ispitanici s AB s AA genotipom; MCI-AA - ispitanici s MCI s AA genotipom; AB-GG - ispitanici s AB s GG genotipom; MCI-GG - ispitanici s MCI s GG genotipom; AB-GA - ispitanici s AB s GA genotipom; MCI-GA - ispitanici s MCI s GA genotipom. **** $p < 0,0001$, post-hoc Dunn test s Benjamini-Hochberg korekcijom.

Utvrđeno je da nema značajnih razlika u broju bodova postignutih na MMSE testu između ispitanika s AB, nosioca AA, GG ili GA genotipova, obzirom na IL-10 rs1800896. Također, nisu utvrđene značajne razlike u broju bodova na MMSE testu između ispitanika s MCI nosioca AA, GG ili GA genotipova. Međutim, pokazano je da postoje, očekivano, značajne razlike u broju bodova na MMSE testu, između ispitanika s AB, nosioca AA genotipa i ispitanika s MCI, nosioca AA genotipa ($p < 0,0001$). Nadalje, postoje značajne razlike u broju bodova postignutih na MMSE testu između ispitanika s AB, nosioca GG genotipa i ispitanika s MCI, nosioca GG genotipa ($p < 0,0001$). Također postoje značajne ($p < 0,0001$) razlike između ispitanika s AB, nosioca GA genotipa i ispitanika s MCI, nosioca GA genotipa (Slika 4.27.).

4.10. Razlike u broju bodova postignutih na Testu crtanja sata obzirom na genotip kod ispitanika s Alzheimerovom bolesti i ispitanika s blagim kognitivnim poremećajem

4.10.1. Razlike u broju bodova postignutih na Testu crtanja sata obzirom na IL-1 α rs1800587 kod ispitanika s Alzheimerovom bolesti i ispitanika s blagim kognitivnim poremećajem

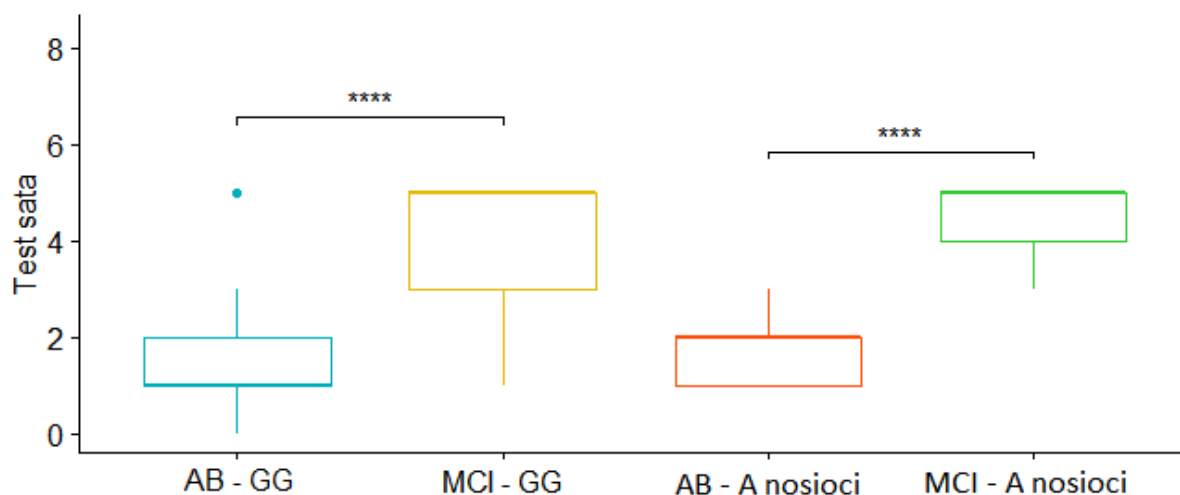
Kako bi testirali razlike u broju bodova postignutih na Testu crtanja sata obzirom na IL-1 α rs1800587 kod ispitanika s AB i MCI, korištena je Kruskal-Wallisova ANOVA radi odstupanja od normalne razdiobe podataka. Utvrđena je značajna razlika u broju bodova postignutih na Testu crtanja sata obzirom na IL-1 α rs1800587 kod ispitanika s AB i MCI ($H = 66,01$; $p < 0,001$). Pokazano je da nema značajnih razlika u broju bodova postignutih na Testu crtanja sata unutar ispitanika s AB, nosioca CC, CT i TT genotipa, kao niti unutar ispitanika s MCI obzirom na IL-1 α rs1800587 (Slika 4.28.). Međutim, pokazano je da postoje, očekivano, značajne razlike u broju bodova na Testu crtanja sata, između ispitanika s AB, nosioca CC genotipa i ispitanika s MCI, nosioca CC genotipa. Također su utvrđene značajne razlike u broju bodova postignutih na Testu crtanja sata, između ispitanika s AB, nosioca CT genotipa i ispitanika s MCI, nosioca CT genotipa. Postoje i značajne razlike u broju bodova postignutih na Testu crtanja sata, između ispitanika s AB, nosioca TT genotipa i ispitanika s MCI, nosioca TT genotipa (Slika 4.28.).



Slika 4.28. Rezultati Testa crtanja sata kod ispitanika s Alzheimerovom bolesti i blagim kognitivnim poremećajem podijeljenih prema genotipovima obzirom na IL-1 α rs1800587. Rezultati su prikazani kao medijan (središnja linija) i donji i gornji kvartil (od 25. do 75. percentila); AB-TC - ispitanici s AB s TC genotipom; MCI-TC - ispitanici s MCI s TC genotipom; AB-CC - ispitanici s AB s CC genotipom; MCI-CC - ispitanici s MCI s CC genotipom; AB-TT - ispitanici s AB s TT genotipom; MCI-TT - ispitanici s MCI s TT genotipom. * $p < 0,05$; **** $p < 0,0001$, post-hoc Dunn test s Benjamini-Hochberg korekcijom.

4.10.2. Razlike u broju bodova postignutih na Testu crtanja sata obzirom na TNF- α rs1800629 kod ispitanika s Alzheimerovom bolesti i ispitanika s blagim kognitivnim poremećajem

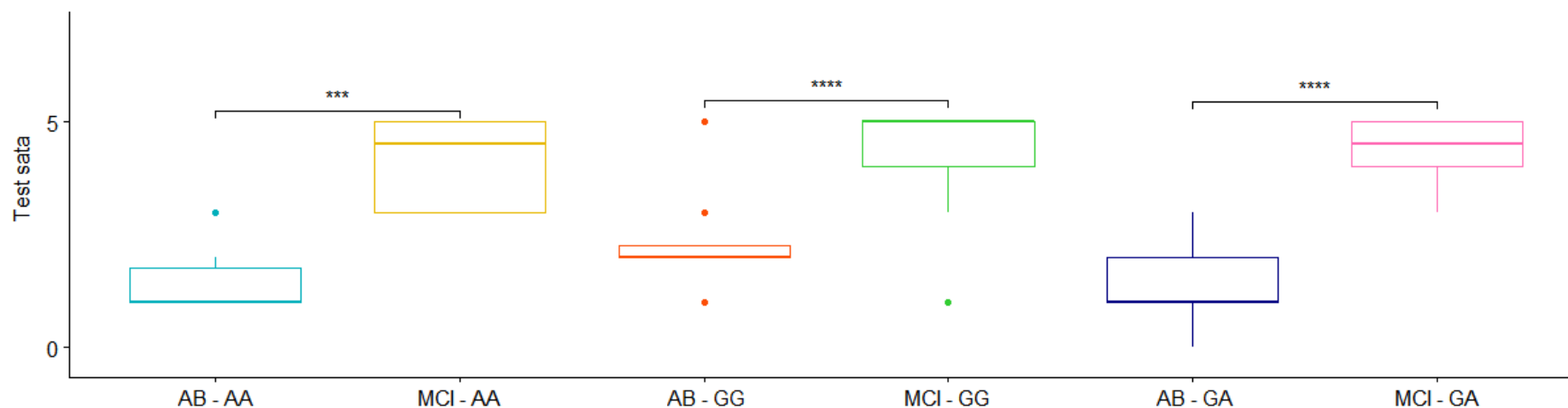
Testirane su razlike u broju bodova postignutih na Testu crtanja sata, obzirom na TNF- α rs1800629 kod ispitanika s AB i MCI. Kruskal-Wallisova analiza je pokazala značajnu razliku u broju bodova postignutih na Testu crtanja sata, obzirom na TNF- α rs1800629 kod ispitanika s AB i MCI ($H = 63,968$; $p < 0,001$). Utvrđeno je da nema značajnih razlika u broju bodova postignutih na Testu crtanja sata između ispitanika s AB, nosioca GG genotipa prema A nosiocima obzirom na TNF- α rs1800629. Isto tako, nisu utvrđene značajne razlike u broju bodova na Testu crtanja sata između ispitanika s MCI koji su bili nosioci GG genotipa prema A nosiocima (Slika 4.29.). Međutim, kao i u prijašnjim rezultatima, utvrđene su očekivano značajne razlike u broju bodova na Testu crtanja sata, između ispitanika s AB, nosioca GG genotipa i ispitanika s MCI, nosioca GG genotipa. Također su utvrđene značajne razlike u broju bodova postignutih na Testu crtanja sata, između ispitanika s AB, nosioca A i ispitanika s MCI, nosioca A (Slika 4.29.).



Slika 4.29. Rezultati Testa crtanja sata kod ispitanika s Alzheimerovom bolesti i blagim kognitivnim poremećajem podijeljenih prema genotipovima obzirom na TNF- α rs1800629. Rezultati su prikazani kao medijan (središnja linija) i donji i gornji kvartil (od 25. do 75. percentila); AB-GG-ispitanici s AB s GG genotipom; MCI-GG-ispitanici s MCI s GG genotipom; AB-A nosioci-ispitanici s AB, A nosioci; MCI-A nosioci-ispitanici s MCI-A nosioci. **** $p < 0,0001$, post-hoc Dunn test s Benjamini-Hochberg korekcijom.

4.10.3. Razlike u broju bodova postignutih na Testu crtanja sata obzirom na genotip IL-10 rs1800896 kod ispitanika s Alzheimerovom bolesti i ispitanika s blagim kognitivnim poremećajem

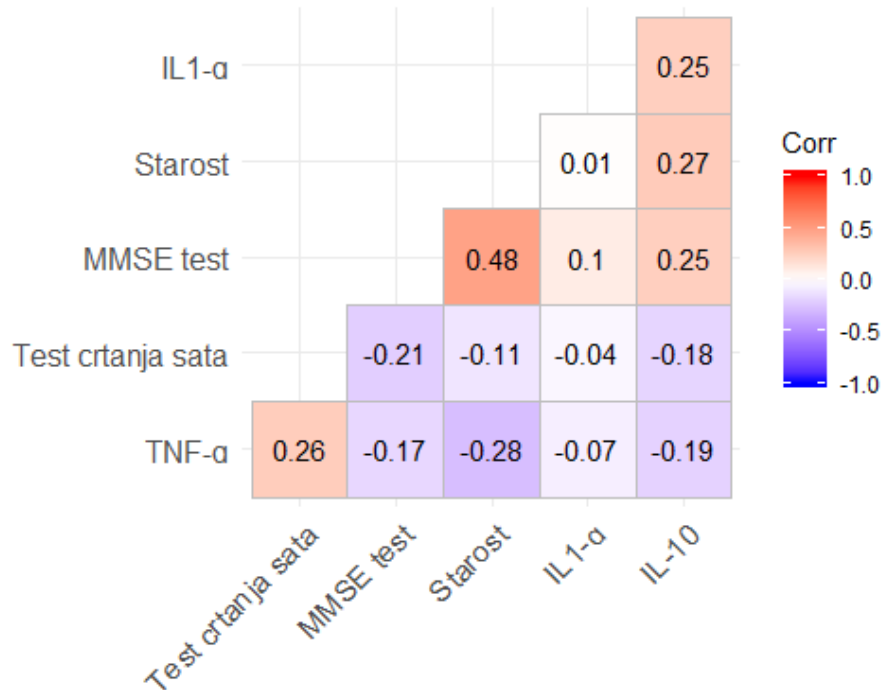
Analizirane su moguće razlike u broju bodova postignutih na Testu crtanja sata obzirom na IL-10 rs1800896 kod ispitanika s AB i MCI. Kruskal-Wallisova analiza je pokazala značajnu razliku u broju bodova na Testu crtanja sata kod ispitanika s AB i MCI podijeljenih prema genotipovima obzirom na IL-10 rs1800896 ($H = 66,72$; $p < 0,001$). Slika 4.30. pokazuje kako nema značajnih razlika u broju bodova postignutih na Testu crtanja sata između ispitanika s AB, nosioca GG, GA ili AA genotipa obzirom na IL-10 rs1800896. Isto tako, nisu utvrđene značajne razlike u broju bodova na Testu crtanja sata između ispitanika s MCI koji su bili nosioci GG, GA ili AA genotipa (Slika 4.30.). Međutim, kao potvrda prijašnjih rezultata, primijećene su očekivano značajne razlike u broju bodova na Testu crtanja sata, između ispitanika s AB, nosioca GG genotipa i ispitanika s MCI, nosioca GG genotipa; između ispitanika s AB, nosioca AA genotipa i ispitanika s MCI, nosioca AA genotipa i između ispitanika s AB, nosioca GA genotipa i ispitanika s MCI, nosioca GA genotipa obzirom na IL-10 rs1800896 (Slika 4.30.).



Slika 4.30. Rezultati Testa crtanja sata kod ispitanika s Alzheimerovom bolesti i blagim kognitivnim poremećajem podijeljenih prema genotipovima obzirom na IL-10 rs1800896. Rezultati su prikazani kao medijan (središnja linija) i donji i gornji kvartil (od 25. do 75. percentila); AB-AA - ispitanici s AB s AA genotipom; MCI-AA - ispitanici s MCI s AA genotipom; AB-GG - ispitanici s AB s GG genotipom; MCI-GG - ispitanici s MCI s GG genotipom; AB-GA - ispitanici s AB s GA genotipom; MCI-GA - ispitanici s MCI s GA genotipom.*** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$, post-hoc Dunn test s Benjamini-Hochberg korekcijom.

4.11. Korelacije demografskih i kognitivnih varijabli s koncentracijama citokina TNF- α , IL-1 α i IL-10

4.11.1. Korelacije demografskih i kognitivnih varijabli s koncentracijama citokina IL-1 α , TNF- α i IL-10 za ispitanike s AB



Slika 4.31. Korelacijska matrica demografskih i kognitivnih varijabli s koncentracijama citokina IL-1 α , TNF- α i IL-10 za ispitanike s AB

Prema Slici 4.31. nema značajne povezanosti (značajne korelacije) između dobi, broja bodova na Testu crtanja sata i MMSE testa s koncentracijama citokina IL-1 α , TNF- α i IL-10 u ispitanika s AB. Dakle nije utvrđena značajna korelacija između dobi, Testa crtanja sata i MMSE testa s koncentracijama citokina IL-1 α , TNF- α i IL-10 ispitanika s AB.

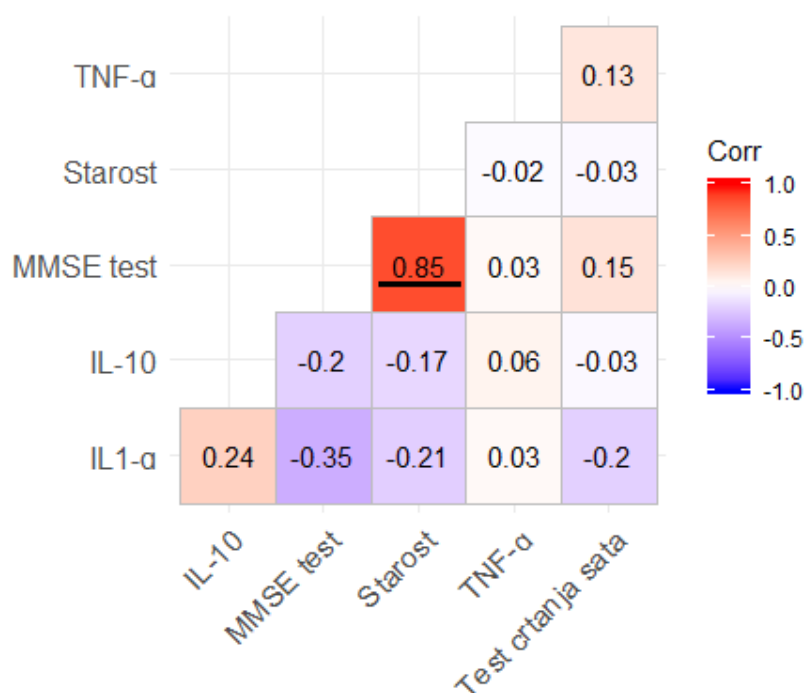
Tablica 4.13. Prikaz koeficijenta korelacije između dobi, Testa crtanja sata i MMSE testa s koncentracijama citokina IL-1 α , TNF- α i IL-10 u ispitanika s AB (Spearmanov koeficijent korelacije $p < 0,005$)

	TNF- α	IL-1 α	IL-10	Test crtanja sata	MMSE test	Dob
TNF- α	$p = 0,000$	$p = 0,512$	$p = 0,154$	$p = 0,319$	$p = 0,157$	$p = 0,086$
IL-1 α	$p = 0,512$	$p = 0,000$	$p = 0,581$	$p = 0,514$	$p = 0,978$	$p = 0,797$
IL-10	$p = 0,154$	$p = 0,581$	$p = 0,000$	$p = 0,155$	$p = 0,442$	$p = 0,418$
Test crtanja sata	$p = 0,319$	$p = 0,514$	$p = 0,155$	$p = 0,000$	$p = 0,115$	$p = 0,239$
MMSE test	$p = 0,157$	$p = 0,978$	$p = 0,442$	$p = 0,115$	$p = 0,000$	$p = 0,099$
Dob	$p = 0,086$	$p = 0,797$	$p = 0,418$	$p = 0,239$	$p = 0,099$	$p = 0,000$

MMSE – Mini-mental skala za praćenje kognicije

Tablica 4.13. pokazuje nedostatak značajne korelacije između dobi, Testa crtanja sata i MMSE testa s koncentracijama citokina IL-1 α , TNF- α i IL-10 u ispitanika s AB.

4.11.2. Korelacije demografskih i kognitivnih varijabli s citokinima IL-1 α , TNF- α i IL-10 za ispitanike s MCI



Slika 4.32. Korelacijska matrica demografskih i kognitivnih varijabli s citokinima IL-1 α , TNF- α i IL-10 za skupinu MCI

Prema Slici 4.32. nema značajne povezanosti između dobi, Testa crtanja sata i MMSE testa s koncentracijama citokina IL-1 α , TNF- α i IL-10 ispitanika s MCI. Naime, niti jedan korelacijski koeficijent nije značajan osim korelacije između MMSE testa i starosti (dobi) ispitanika. Korelacija je visoka ($r = 0,85$), što znači da su stariji ispitanici rješavali MMSE test slabije od mlađih ispitanika.

Tablica 4.14. Prikaz značajnosti koeficijenta korelacije između dobi, Testa crtanja sata i MMSE testa s koncentracijama citokina IL-1 α , TNF- α i IL-10 ispitanika s MCI (Spearmanov koeficijent korelacije $p < 0,005$)

	TNF-α	IL-1α	IL-10	Test crtanja sata	MMSE test	Dob
TNF- α	$p = 0,000$	$p = 0,896$	$p = 0,883$	$p = 0,908$	$p = 0,638$	$p = 0,554$
IL-1 α	$p = 0,896$	$p = 0,000$	$p = 0,348$	$p = 0,305$	$p = 0,063$	$p = 0,157$
IL-10	$p = 0,83$	$p = 0,348$	$p = 0,000$	$p = 0,566$	$p = 0,132$	$p = 0,172$
Test crtanja sata	$p = 0,908$	$p = 0,305$	$p = 0,566$	$p = 0,000$	$p = 0,865$	$p = 0,832$
MMSE test	$p = 0,638$	$p = 0,063$	$p = 0,132$	$p = 0,865$	$p = 0,000$	$p = 0,00165^*$
Dob	$p = 0,554$	$p = 0,157$	$p = 0,172$	$p = 0,832$	$p = 0,00165^*$	$p = 0,000$

MMSE – Mini-mental skala za praćenje kognicije

Tablica 4.14. pokazuje nedostatak značajne povezanosti između dobi, Testa crtanja sata i MMSE testa s koncentracijama citokina IL-1 α , TNF- α i IL-10 ispitanika s MCI. Očekivano, pronađena je značajna korelacija između broja bodova na skali MMSE i dobi ($p = 0,00165$) u ispitanika s MCI. Stariji ispitanici su slabije rješavali MMSE test nego mlađi ispitanici.

5. RASPRAVA

5.1. Rezultati istraživanja

Rezultati ovog istraživanja su utvrdili:

1. postojanje značajnih razlika u koncentraciji citokina IL-1 α , TNF- α i IL-10 između ispitanika s AB i MCI - ispitanici s AB imali su značajno povišenu koncentraciju TNF- α i značajno sniženu koncentraciju IL-10 i IL-1 α u serumu prema vrijednostima kod ispitanika s MCI;
2. nedostatak značajne povezanosti između koncentracije IL-1 α , TNF- α i IL-10 u serumu ispitanika s kognitivnim simptomima;
3. nedostatak značajnih razlika u raspodjeli IL-10 rs1800896, TNF- α rs1800629 i IL-1 α rs1800587 genotipova ili alela između ispitanika s AB i MCI;
4. nedostatak značajne povezanosti između polimorfizma IL-10 rs1800896, TNF- α rs1800629 i IL-1 α rs1800587 s kognitivnim simptomima u ispitanika s AB i MCI;
5. nedostatak značajne povezanosti između koncentracije IL-1 α , TNF- α i IL-10 i odgovarajućih polimorfizma za IL-10 rs1800896, TNF- α rs1800629 i IL-1 α rs1800587 – ispitanici koji su bili podijeljeni prema IL-10 rs1800896, TNF- α rs1800629 i IL-1 α rs1800587 genotipovima imali su slične IL-1 α , TNF- α i IL-10 koncentracije;
6. dob i spol nisu bili značajni prediktori koncentracije citokina u serumu ispitanika s AB i MCI;
7. samo je dob bila značajno korelirana s bodovima na skali MMSE u ispitanika s MCI, jer su stariji ispitanici lošije rješili MMSE test od mlađih ispitanika.

5.2. Ispitanici

U naše istraživanje bilo je uključeno ukupno 174 ispitanika od kojih je bilo 69 muškaraca i 105 žena. Nije bilo značajne razlike u zastupljenosti muških i ženskih ispitanika između ispitanika s AB i ispitanika s MCI. Tako je udio ženskih ispitanica kod ispitanika s MCI bio 56 %, a kod AB 66 %. Naši su rezultati usklađeni s onima iz literature, gdje je pokazano kako se učestalost AB ne razlikuje po spolu američkih ispitanika čak i nakon 85 godina života (Edland i sur., 2002). Naši su rezultati potvrđeni i s našim novim podacima u nedavnom radu (Culjak i sur., 2020) gdje je pokazano na velikom broju ispitanika (N = 645) kako nema značajne razlike u zastupljenosti muškaraca i žena kod skupine ispitanika s AB (N = 395) i skupine ispitanika s MCI (N = 250). Dakle ti podatci upućuju da kod ispitanika hrvatske populacije koji su nam bili dostupni za istraživanja, nema značajnih razlika u omjeru muških i ženskih ispitanika koji boluju od AB ili MCI. I druge studije, sukladne našim rezultatima, nisu pokazale značajne

razlike između zastupljenosti muških i ženskih ispitanika kod ispitanika s AB, ispitanika s MCI, zdravih kontrola ili kod ispitanika sa subjektivnim poteškoćama u pamćenju (Italiani i sur., 2018).

S druge strane, naši rezultati nisu sukladni rezultatima napravljenim na ispitanicima europskog porijekla, gdje je pokazano da žene češće razvijaju AB od muškaraca nakon 80. godine života (Fratiglioni i sur., 1997). U literaturi se često pronalaze podatci o spolno ovisnim razlikama u razvoju AB, naime žene češće razvijaju AB od muškaraca (Fratiglioni i sur., 1997; Rocca, 2017; Mielke, 2018). Nedavna je analiza izlistala moguće razloge za spolom uvjetovane razlike u učestalosti AB kod žena prema muškarcima (Ferretti i sur., 2018). Naime, studija je utvrdila da u cijelom svijetu više žena nego muškaraca ima AB i to u omjeru 2 : 1; no ta je prevalencija otkrivena u nekim zemljopisnim regijama dok u drugima to nije potvrđeno; taj je učinak, iako značajan, ustvari umjeren i na njega utječe duži životni vijek žena u odnosu na muškarce. Međutim, na spolom uvjetovane razlike u razvoju AB utječu i životni i socijalno-ekonomski čimbenici, te prevalencija depresije, metaboličke i kardiovaskularne bolesti, koje se značajno razlikuju između muškaraca i žena (Ferretti i sur., 2018). Smatra se da nedostatak obrazovanja u zemljama s nižim socio-ekonomskim statusom može povećavati rizik za razvoj AB u žena (Ferretti i sur., 2018). Ta je studija predložila kako se u budućim i kliničkim i pretkliničkim studijama treba obavezno napraviti stratifikacija rezultata prema spolu, što znači da ne treba samo provjeriti statističku značajnost rezultata kontroliranu za spol, nego i da sve rezultate treba analizirati posebno prema spolu (Ferretti i sur., 2018). To smo mi prihvatili i učinili stratifikaciju rezultata prema spolu i u našoj studiji.

Životni vijek žena je duži nego za muškarce, a dob je najveći čimbenik rizika za AB (Plassman i sur., 2007). Iako je udio žena u AB veći nego muškaraca, spolne razlike u učestalosti demencija su manje jasni i mogu varirati od zemlje do zemlje i tijekom vremenskih razdoblja (Rocca i sur., 2017). Studije u nekoliko europskih zemalja navode da žene imaju veću učestalost AB nakon 80. godine života (Fratiglioni i sur., 1997; Letenneur i sur., 1999). Suprotno navedenim istraživanjima, studija kognitivnih funkcija i starenja u Ujedinjenom Kraljevstvu navodi veću incidenciju AB kod muškaraca (Matthews i sur., 2016).

Razlozi oprečnih rezultata nisu dovoljno istraženi, ali upućuju da na spolne razlike u učestalosti AB mogu utjecati vremensko razdoblje istraživanja i zemljopisna regija (Mielke i sur., 2014). Smatra se da AB utječe više na žene nego na muškarce (Plassman i sur., 2007). Jedan od razloga

je duži životni vijek žena te radi toga žene vjerojatnije češće od muškaraca obolijevaju od AB u starijoj dobi. Uz to se pretpostavlja da spolni hormoni kod žena imaju utjecaja na razvoj AB (Viña i Loret, 2010). Naime, koncentracija hormona estrogena smanjuje se u ženskom tijelu nakon menopauze, a estrogen ima protektivnu ulogu u mozgu mladih žena od oštećenja. Kako koncentracije estrogena opadaju u starijoj dobi, neuroni postaju osjetljiviji na oštećenja u starijoj dobi (Viña i Lloret, 2010).

Postoje čimbenici rizika koji imaju isti učinak kod žena i muškaraca na razvoj AB, ali imaju različitu učestalost, npr. povijesno su žene imale manji pristup obrazovanju, a kod muškaraca je veća učestalost pušenja (Rocca i sur., 2014). Nadalje, traume glave su češće kod muškaraca, ali žene mogu biti osjetljivije na štetne učinke ozljede glave (Rocca i sur., 2014). Zatim postoje čimbenici rizika koji su ograničeni na jedan spol, kao što su trudnoća, terapija raka prostate, uklanjanje androgena (Rocca i sur., 2014).

Žene imaju dvostruko veći rizik od depresije u odnosu na muškarce (Kessler i sur., 1993). Depresija značajno utječe na kogniciju tijekom cijelog životnog vijeka, jer su u depresiji posebno zahvaćeni procesi raspoloženja i poteškoće u pamćenju (Mielke, 2019). Navodi se da depresija u srednjoj životnoj dobi povećava rizik od AB za čak 70 % (Ownby i sur., 2006). Za razliku od depresije, muškarci imaju veću ukupnu prevalenciju apneje u snu, iako prevalencija apneje u snu kod žena značajno raste nakon menopauze (Bixler i sur., 2001). Apneja u spavanju i poremećaji ritma spavanja povezani su s padom kognitivnih funkcija i povećanim rizikom od AB (Lim i sur., 2013).

Smatra se da muškarci koji se nikad nisu vjenčali ili su udovci imaju veći rizik za razvoj AB u odnosu na žene (Pankratz i sur., 2015). Nasuprot oprečnim podacima o spolnim razlikama u AB, MCI se češće dijagnosticira u muškaraca (Roberts i sur., 2012).

Osim toga, muškarci i žene s MCI ili AB pokazuju razlike u kognitivnim i psihijatrijskim simptomima (Ferretti i sur., 2018). Naime, postoje značajne razlike u kognitivnim sposobnostima između muškaraca i žena, jer je pokazano da muškarci pokazuju bolje rezultate na testovima prostorne orijentacije dok žene imaju bolje rezultate u verbalnim sposobnostima i otkrivanju smještaja predmeta (Li i Singh, 2014). Međutim, čini se da te razlike nisu temeljene na razlikama u koncentraciji beta-amiloidnog peptida između muškaraca i žena, jer su one slične, no u žena s MCI brže se razvija atrofija mozga od muškaraca (Ferretti i sur., 2018). U našoj studiji smo provjerili podatke o mogućim spolno izazvanim razlikama na kogniciji kod muških i ženskih ispitanika s AB i MCI i to u broju bodova na skali MMSE i Testu crtanja sata.

Naši su rezultati pokazali da nema značajnih razlika u broju bodova na MMSE testu i Testu crtanja sata između muških i ženskih bolesnika s AB niti između muških i ženskih ispitanika s MCI. Rezultati MMSE testa naše studije i naših ispitanika oprečni su istraživanju na francuskoj populaciji s AB, mlađim od devedeset godina, gdje su žene imale niži broj bodova na testu MMSE u usporedbi s muškarcima iste dobi i obrazovne razine (Pradier i sur., 2014). Neke studije upućuju da povezanost između neurodegenerativnih oštećenja i kliničkog oblika bolesti može biti izraženija kod žena nego kod muškaraca (Pernecky i sur; 2007; Barnes i sur., 2005). U studiji o spolnim razlikama kao o „rezervi mozga” ističe se da je metabolizam glukoze bio značajno smanjen u kortikalnim regijama mozga u muškaraca u usporedbi sa ženama, što upućuje da je klinička manifestacija demencije povezana s cerebralnim metabolizmom, pa će tako muškarci imati blaže istaknute patološke promjene, za razliku od žena, koje kad razviju AB pokazuju brži pad kognitivnih simptoma (Pernecky i sur., 2007). Ti rezultati nisu ujednačeni jer je pokazano (O'Conner i sur., 1989) kako nema značajnog utjecaja spola na rezultat bodova MMSE testa (O'Conner i sur., 1989), ili je izvješteno o manjoj, ali značajnoj razlici u broju bodova na MMSE testu u korist žena (Ganguli i sur., 1991), ili u korist muškaraca (Fillenbaum i sur., 1988). Razlike u spolu mogu se odnositi samo na ograničena područja kognitivnog funkcioniranja i stoga je potrebno raditi daljnja istraživanja kako bi se razjasnila specifičnost kognitivnih razlika i učinak spola na broj bodova na MMSE testu (Buckwalter i sur., 1993).

Prosječna dob svih ispitanika uključenih u istraživanje je 79 godina (raspon 57 – 89). Što se tiče dobi ispitanika, utvrđena je značajna razlika u dobi između bolesnika s AB i ispitanika s MCI. Bolesnici s AB bili su značajno stariji od ispitanika s MCI. Naš je nalaz bio usaglašen s nalazom iz nedavne studije u kojoj je također pokazano na velikom broju ispitanika (N = 645) kako se skupine ispitanika s AB i MCI značajno razlikuju po dobi, jer je starija dob pronađena u ispitanika s AB (Culjak i sur., 2020). Taj je nalaz očekivan jer je jedan od najvećih čimbenika rizika za AB starija dob (Guerreiro i Bras, 2015; Xia i sur., 2018). Nadalje, incidenti poput traume glave ili mozga mogu ubrzati pojavu simptoma AB (Van den Heuvel i sur., 2007). Vaskularna bolest često je prisutna s AB, te su vaskularne bolesti čimbenici rizika za razvoj AB u devetom i desetom desetljeću života (Vermeer i sur., 2002). Klinička demencija nastaje kada su zaštitni čimbenici iscrpljeni, a teret komorbidnih bolesti i različitih patologija mozga povezanih s dobi doprinose razvoju AB (Stricker i sur., 2011). Studije o utjecaju starenja na razvoj AB nisu ujednačene, no slažu se s navodima da komorbiditeti koji su zajednički za stariju dob (npr. kardiovaskularne i cerebrovaskularne bolest) koji potiču starenje mozga, doprinose

razvoju AB (Jagust i sur., 2008). Alzheimerova demencija nije normalan dio starenja i visoka dob sama po sebi nije dovoljna da uzrokuje Alzheimerovu demenciju (Nelson i sur., 2011). Studija o učincima dobi na stopu progresije AB i demencije s pridruženom cerebrovaskularnom bolesti utvrdila je da dob, AB i cerebrovaskularne bolesti djeluju zajednički na brzinu napredovanja kognitivnih oštećenja (Mungas i sur., 2001). Brzina kognitivnog propadanja lagano se smanjivala s porastom dobi za bolesnike koji nisu imali cerebrovaskularnu bolest, ali se povećavala s godinama kod bolesnika s demencijom i cerebrovaskularnom bolesti (Mungas i sur., 2001). Kognitivne sposobnosti imaju mjerljivo opadanje s godinama (Murman, 2015). Demencija i kognitivna oštećenja su česti u osoba starijih od 85 godina, te se javljaju u više od 50 % starijih osoba i incidencija demencije i dalje raste u najstarijim dobnim skupinama (Reitz i sur., 2011). Kod najstarijih bolesnika koji razvijaju AB, za postizanje najbolje moguće kvalitete života, no ne uz nužno produljenje životnog vijeka, potrebni su palijativna skrb, a ne interventne terapijske intervencije (Reitz i sur., 2011).

Dob je važan čimbenik koji uz AB i cerebrovaskularnu bolest utječe na klinički tijek demencije (Mungas i sur., 2001). Međutim, postoje značajne razlike između tzv. normalnog starenja i demencije jer se u prirodnom normalnom starenju broj neurona ne mijenja značajno tijekom starenja, dok u AB taj broj značajno opada i nastaje gubitak neurona i sinapsi (Xia i sur., 2018).

AB je najčešća kronična neurodegenerativna bolest i vodeći uzrok demencije (Weller i Budson, 2018). Neurodegenerativne bolesti, kao što je AB uzrokuju kroničnu neuroupalu koja rezultira dugotrajnom aktivacijom mikroglije i produljenim oslobađanjem medijatora upale i daljnjim oslobađanjem upalnih čimbenika (Heneka i sur., 2015). Nedavna je meta-analiza pokazala da postoje značajno povišene koncentracije proupalnih citokina TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-2, i IL-18 u perifernoj krvi bolesnika s AB prema vrijednostima u kontrolnim ispitanicima (Lai i sur., 2017). Osjetljivost na upale raste s dobi i može se pojačati pri svakom upalnom događaju. Proupalni i protuupalni citokini mogu imati višestruku ulogu u neurodegeneraciji i neuroprotekciji, stoga se razmišlja o upotrebi protu-upalnih citokina i kontroli proupalnih citokina u terapiji AB (Wang i sur., 2015). Klinički podaci upućuju da inhibitori proupalnih citokina mogu biti održiva strategija za ublažavanje tijeka bolesti (Decourt i sur., 2017). Iako je utvrđeno da bi se pomoću antiupalnih intervencija mogao smanjiti rizik za razvoj AB (Akiyama i sur., 2000), randomizirana klinička studija koja je uključila placebo nije potvrdila tu hipotezu i nije utvrdila kako bi primjena nesteroidnih protuupalnih lijekova imala preventivni učinak na progresiju AB (Aisen i sur., 2003). Promjene u imunološkom sustavu povezane sa

starenjem i pojačano oslobađanje citokina predstavljaju glavne uzroke kronične upale tijekom starenja (Michaud i sur., 2013). Kronična upala je čimbenik rizika za AB u starijih osoba (Rea i sur., 2018). Kao posljedica razvoja upale, istraživane su koncentracije citokina, njihovih receptora i drugih proteina, povezanih s upalnim odgovorima u krvi bolesnika, i to s ciljem kako bi se otkrili mehanizmi neuroupale u demenciji ili u kontekstu istraživanja biomarkera (Wang i sur., 2015). Od presudne je važnosti precizirati ulogu proupalnih citokina u AB, što može pomoći u procjeni mogućih terapijskih postupaka u proupalnoj modulaciji AB (Su i sur., 2016). Još uvijek nema odgovora na pitanja kako različiti čimbenici moduliraju signalizaciju proupalnih citokina i kako se to isprepliće s drugim imunološkim putevima (Zhang i sur., 2007). Većina dobivenih podataka iz različitih studija je proturječna.

5.3. Predviđanje promjena koncentracije citokina

Multipla linearna regresija je upotrijebljena kako bi se istražio prediktivni potencijal spola i dobi na promjene koncentracije citokina u serumu ispitanika s AB i MCI. Ta je analiza pokazala da dob i spol nisu dobri čimbenici u predviđanju promjene koncentracije IL-1 α , TNF- α i IL-10 u ispitanika s AB ili MCI. Ti su rezultati uputili na zaključak da iako su ispitanici s AB bili stariji od ispitanika s MCI, ta razlika nije značajno utjecala na koncentracije IL-1 α , TNF- α i IL-10.

Naši rezultati se razlikuju od studije koja je pokazala da su koncentracije IL-1 α i TNF- α često 2 - 4 puta veće u plazmi starijih ispitanika, posebno u osoba starijih od 80 godina u usporedbi s koncentracijama u odraslih u dobi od 20 – 60 godina (Brünsgaard i Pedersen, 2003). Međutim, povišene koncentracije IL-1 α i TNF- α mogu biti povezane u starijih osoba s većim brojem komorbiditeta te povećanim rizikom od smrtnosti, dok poremećaji upalnih puteva i procesa mogu utjecati na SŽS i biti uključeni u patofiziološke mehanizme neurodegenerativnih poremećaja (Michaud i sur., 2013). Istraživanje o koncentracijama citokina u plazmi kod starijih ispitanika s AB i vaskularnom demencijom podupire povezanost sistemske upale niskog stupnja koja je čest nalaz kod starijih bolesnika s AB i vaskularnom demencijom (Zuliani i sur., 2007).

Identitet čimbenika koji omogućuju pojačanu ekspresiju IL-1 α u starim i starosnim stanicama također zahtijeva daljnja istraživanja (Di Paolo i Shayakhmetov, 2016) i to na razini kvantitativne genomike, proteomike i metabolomike, i ta će istraživanja vjerojatno potvrditi ključnu ulogu IL-1 α za mnoge humane patologije i bolesti (Di Paolo i Shayakhmetov, 2016).

Glavni proupalni citokini, poput IL-6, TNF- α i IL-1 α , značajno doprinose fenomenu starenja i upala kod zdravih starijih osoba (Franceschi i sur., 2000). Njihova uloga je od posebnog značaja u mnogim bolestima vezanim za dob (Franceschi i Campisi, 2014). U studiji o koncentraciji TNF- α u starijoj dobi, TNF- α je bio značajno povećan u stogodišnjaka u usporedbi s mlađim kontrolnim skupinama, a visoka koncentracija TNF- α bila je povezana s AB (Brünsgaard i sur., 1999). Upala povezana sa starenjem može biti uzrokovana padom koncentracije IL-10 tijekom starenja (Moore i sur., 2008). IL-10 je odgovoran za suzbijanje proupalnog djelovanja u različitim tkivima (Asadullah i sur., 2003). IL-10 djeluje kao protuupalni imuno-modulator i smanjuje upalu povezanu s dobi (Dagdeviren i sur., 2017).

Pretjerani proupalni odgovori citokina mogu se primijetiti u starenju, a smanjena koncentracija IL-10 može pridonijeti tim odgovorima (Meador i sur., 2008). Upala prati neurodegenerativne poremećaje, ali nije jasno je li to bio neposredan uzrok bolesti ili posljedica progresivnog degenerativnog procesa koji se dešava u neurodegeneraciji (McGeer i sur., 2016). Smatra se da citokini imaju središnju ulogu u regulaciji imunološkog odgovora uključenih u neurodegeneraciju, te se povećava razumijevanje kako citokini doprinose etiologiji vodećih neurodegenerativnih poremećaja, uključujući AB i Parkinsonovu bolest (Rea i sur., 2018).

Spolni hormoni i imunološki sustav utječu jedni na druge u AB (Butchart i sur., 2013). U našem istraživanju udio ispitanica i s MCI i AB bio je veći nego udio muškaraca što nije utjecalo na značajne razlike u koncentraciji citokina. Veza između pada hormona u menopauzi i povećane koncentracije proupalnih citokina u serumu još uvijek nije potpuno razjašnjena. Postoje studije koje upućuju da žene u postmenopauzi imaju povišene koncentracije proupalnih citokina, posebno TNF-a (Su i Freeman, 2009; Cioffi i sur., 2002). Deficit testosterona povezuje se sa sustavnim upalama, što može biti povezano s povećanjem proupalnih citokina (Mohamad i sur., 2019).

Među biološkim mehanizmima koji utječu na razlikovanje normalnog i patološkog procesa starenja, upala je jedan od najistraživanijih procesa (Miller, 1996). Upala predstavlja fiziološki proces kao odgovor na endogene ili egzogene ugroze (Akiyama i sur., 2000). Promjene u imunološkom sustavu vezane za dob poznate su kao „imunosenescencija” (Michaud i sur., 2013). Posljedice kronične upale mogu povećati rizik od komorbiditeta i smrtnosti (Michaud i sur., 2013). Proupalni citokini kroz različite mehanizme kao što su aktiviranje trombocita i aktivacija endotela mogu utjecati na nastanak kardiovaskularnih bolesti (Cesari i sur., 2004). Neravnoteža imunog sustava može utjecati na SŽS i biti uključena u patofiziološke mehanizme nastanka neurodegenerativnih poremećaja (Cesari i sur., 2004). Starenje je povezano s promjenama cirkulirajućih citokina i proupalnih markera (Weiskopf i sur., 2009). Proupalni

citokini pokazuju povišene koncentracije u patologiji neurodegenerativnih bolesti kao što je AB. Periferni citokini mogu utjecati na nastanak ili na kognitivno propadanje u AB (Yeh i Schuster., 1999).

5.4. Citokin IL-1 α

5.4.1. Koncentracija IL-1 α u serumu ispitanika s Alzheimerovom bolesti i ispitanika s blagim kognitivnim poremećajem

Prema rezultatima našeg istraživanja, bolesnici s AB su imali značajno snižene vrijednosti koncentracije IL-1 α u perifernoj krvi, u odnosu na vrijednosti IL-1 α u serumu kod ispitanika s MCI. Taj je nalaz sukladan rezultatima istraživanja provedenog na turskoj populaciji gdje je koncentracija IL-1 α bila značajno snižena u 30 ispitanika s kasnim oblikom AB u odnosu na 53 ispitanika s MCI (Dursun i sur., 2015). Međutim, naši se rezultati ne slažu s istraživanjem provedenim na 260 talijanskih ispitanika, bolesnika s AB te ispitanika s amnestičkim oblikom MCI, subjektivnim tegobama pamćenja i normalnom zdravom skupinom, gdje je izvješteno da je koncentracija IL-1 α bila niska (ispod razine detekcije) u ispitanika s MCI i ispitanika sa subjektivnim tegobama pamćenja, dok su bolesnici s AB pokazali mali, ali statistički značajan porast koncentracije IL-1 α samo u odnosu za zdrave kontrole, ali ne i na ispitanike s MCI ili subjektivnim kognitivnim tegobama (Italiani i sur., 2018). Dakle, možemo zaključiti da je ta studija (Italiani i sur., 2018) pokazala da se koncentracija IL-1 α ne razlikuje značajno između ispitanika s AB i MCI, dok smo mi utvrdili da je koncentracija IL-1 α značajno snižena kod bolesnika s AB prema ispitanicima s MCI. Razlike postoje u broju ispitanika između naše i njihove studije (Italiani i sur., 2018), jer mi smo uvrstili 100 ispitanika s MCI i 74 bolesnika s AB u odnosu na 60 bolesnika s AB prema 45 ispitanika s amnestičkim MCI (Italiani i sur., 2018). Nadalje, razlike u ispitanicima s MCI (kod nas su svi ispitanici imali MCI) dok je u njihovoj studiji (Italiani i sur., 2018) ta skupina podijeljena na 45 osoba s amnestičkim MCI te 61 osobu sa subjektivnim kognitivnim tegobama, mogu biti razlogom tih varijabilnih rezultata. IL-1 α je bio istraživani, među 18 proteina plazme, u cilju stvaranja multi-panela koji može razlikovati ispitanike s AB od kontrolne skupine i u toj je studiji zaključeno da takav multi-panel može razlikovati skupine s 90 % točnosti (Ray i sur., 2007). Ponavljajuća istraživanja nisu dala jednoznačne rezultate (Biella i sur., 2013). Nadalje, u longitudinalno praćenim ispitanicima je pokazano da postoji značajna povezanost između koncentracije IL-1 α i demencije na južnokorejskoj populaciji starijoj od 65 godina, praćenju 2,4 godine, gdje su ispitanicima mjerene koncentracije citokina na početku i u tijeku praćenja (Kim i sur., 2018).

Rezultati navedene studije upućuju da demencija može biti uzrok upale, a ne posljedica povišene razine proupalnih citokina kao što su IL-1 α , IL1 β i TNF- α (Kim i sur., 2018). Razlike između rezultata studija mogu biti objašnjene i činjenicom da je koncentraciju citokina IL-1 α i IL-1 β teško odrediti u humanoj krvi jer su one povezane sa specifičnim mjestom gdje je upala nastala (Ter Horst i sur., 2016). Međutim, pronađene su povišene koncentracije topive forme receptora sIL-1R1 kod bolesnika s AB prema zdravim kontrolnim ispitanicima te ispitanicima s MCI i subjektivnim kognitivnim tegobama (Italiani i sur., 2018). Takvi nalazi upućuju da je AB karakterizirana s povećanom aktivnošću IL-1 sustava, što je suprotno našim nalazima. Osim citokina IL-1 α i IL-1 β se često istražuje u AB, te je nedavna meta-analiza (Ng i sur., 2018) pokazala značajno povišenu perifernu koncentraciju IL-1 β u starijih ispitanika s AB, no ta se značajnost izgubila nakon korekcije za multiplo testiranje. No, povišena koncentracija IL-1 β se povezuje s njegovom ulogom u nastanku β -amiloidnih plakova (Griffin i sur., 1998) i fosforilaciji tau proteina (Li i sur., 2003). Suprotno našim rezultatima, pronađena je i povišena koncentracija IL-1 α u ispitanika iz Bagdada s AB prema zdravim ispitanicima (Hamdan i sur., 2014).

Pronađeno je da je IL-1 α prekomjerno izražen u glija stanicama kod bolesnika s AB, što je uzrokovalo oslobađanje peptidnih fragmenata i aktiviranje astrocita koji su blisko povezani s amiloidnim plakovima u mozgu u bolesnika s AB (Hayes i sur., 2004). Treba istaknuti da suprotno upalnoj hipotezi nastanka AB, naši rezultati pokazuju da ispitanici s AB imaju snižene vrijednosti IL-1 α u serumu u odnosu na ispitanike s MCI. Međutim, velik dio studija je uspoređivao vrijednosti IL-1 α u serumu ispitanika s AB prema zdravim ispitanicima, dok smo mi to usporedili prema ispitanicima s MCI. Naime smatra se da je MCI prijelazni oblik između normalnog starenja i kognitivnih poremećaja u demenciji (Campbell i sur., 2013). Naši su nalazi korigirani za mogući utjecaj dobi, spola, ali i gubitka kognitivnih sposobnosti mjerenih skalom MMSE i Testom crtanja sata na koncentracije IL-1 α u serumu. Svi ti čimbenici nisu utjecali na koncentraciju IL-1 α u serumu ispitanika s AB ili kod ispitanika s MCI. Ovakvi različiti rezultati upućuju na zaključak da bi se u budućim studijama trebalo uvrstiti i veći broj ispitanika i ispitanike sa sličnim fazama bolesti kako bi se istražila povezanost IL-1 α i AB.

Neujednačenost u rezultatima može upućivati na razlike u dijagnostičkoj metodi, niske i često izvan granica detekcije razine koncentracije, različite etničke skupine, kao i specifičan stadij bolesti. IL-1 α je jak bioaktivni citokin, koji se u normalnim i patološkim uvjetima uglavnom ne registrira u perifernoj cirkulaciji jer mu je aktivnost ograničena na mjesta tkiva gdje se odvija

upalna reakcija (Italiani i sur., 2018). Suprotno upalnoj hipotezi, u našem istraživanju utvrdili smo niže koncentracije IL-1 α u bolesnika s AB, u odnosu na ispitanike s MCI. Većina autora u svojim istraživanjima uspoređuje bolesnike s AB sa zdravim ispitanicima koji se koriste kao kontrolna skupina. U našem istraživanju fokusirali smo se na razliku između bolesnika s AB i ispitanika s MCI, jer smo smatrali da su ispitanici s MCI odgovarajuća kontrolna skupina jer oni pokazuju smanjeno kognitivno funkcioniranje i to je prijelazno stanje iz normalnog starenja u demenciju. U budućnosti će biti potrebno dalje istraživati, kako bi se utvrdila stvarna povezanost između IL-1 α i demencije.

5.4.2. Koncentracija IL-1 α i kognitivni simptomi

Naši su rezultati pokazali da koncentracija IL-1 α nije bila značajno povezana s brojem bodova na skalama MMSE i Testu crtanja sata, niti kod bolesnika s AB niti kod ispitanika s MCI. Sukladno tom nalazu, regresijska analiza nije utvrdila prediktivnu vrijednost dobi na koncentraciju IL-1 α u serumu ispitanika s AB i MCI. IL-1 sustav je važan za normalno kognitivno funkcioniranje (Yirmiia i sur., 2011). Studija provedena između bolesnika s različitim stupnjevima kognitivnih poremećaja (blagi, umjereni i teški) i kontrolne skupine bez demencije izvješćuje da nije bilo značajne razlike u koncentraciji IL-1 α između navedenih skupina (Bonotis i su., 2008). Taj se nalaz slaže s našim rezultatima, jer nije pronađena značajna korelacija između broja bodova na skalama MMSE i Testu crtanja sata i koncentracije IL-1 α niti kod ispitanika s MCI niti u bolesnika s AB. Pretklinički podaci i rezultati dobiveni na animalnim modelima upućuju da je intaktni IL-1 sustav važan za očuvanje kognitivnih funkcija kao što su učenje i pamćenje (Murray i sur., 2013). Pokazano je da sustavna upala negativno utječe na kognitivne (radno pamćenje) funkcije te izaziva apoptozu neurona putem IL-1 posredovanih mehanizama (Skelly i sur., 2019).

U našem istraživanju nije pronađena poveznica između kognitivnog propadanja i koncentracije IL-1 α , jer nije utvrđena značajna korelacija između broja bodova na skalama MMSE i Testu crtanja sata kod bolesnika s AB ili s MCI. Međutim, nalaz da naši bolesnici s AB imaju značajno snižene vrijednosti koncentracije IL-1 α u perifernoj krvi, u odnosu na vrijednosti IL-1 α u serumu kod ispitanika s MCI, upućuje na pretpostavku da je snižena koncentracija IL-1 α povezana s težim oštećenjem koje nastaje u AB.

Dostupni literaturni podaci ne navode korelaciju između IL-1 α i rezultata MMSE testa. To potvrđuje i studija čiji rezultati nisu pokazali povezanost između koncentracije IL-1 α i broja bodova MMSE testa između istraživanih skupina bolesnika s AB s ranim početkom, AB s

kasnim početkom, s Parkinsonovom bolesti i ispitanika s MCI, te zdrave kontrolne skupine (Dursun i sur., 2015).

5.4.3. Povezanost polimorfizma gena IL-1 α rs1800587 i Alzheimerove bolesti

Rezultati naše studije nisu utvrdili značajnu povezanost između AB i polimorfizma gena IL-1 α rs1800587. Rezultati iz literature o povezanosti između AB i polimorfizma gena IL-1 α rs1800587 su neujednačeni (Su i sur., 2016; Qin i sur., 2012; Hua i sur., 2012; Li i sur., 2013; Dong i sur., 2017). U našoj studiji nisu pronađene razlike u raspodjeli IL-1 α genotipova (TT, TC i CC) ili T i C alela između bolesnika s AB i ispitanika s MCI. Sukladno našim nalazima, ta povezanost nije utvrđena u drugim studijama (Babic Leko i sur., 2020; Bertram i sur., 2007; Serretti i sur., 2009; Tian i sur., 2015; Yildiz i sur., 2015). Naime, slično našim nalazima, nije pronađena značajna povezanost IL-1 α rs1800587 polimorfizma s AB u dvije studije koje su uključile bolesne / zdrave ispitanike iz Grčke i Italije (Serretti i sur., 2009). Kako bi bolje istražili naš rezultat o nedostatku povezanosti između IL-1 α rs1800587 polimorfizma i AB, prikupili smo bolesnike hrvatskog porijekla s AB i MCI iz drugih protokola i naših prijašnjih studija (Babic Leko i sur., 2020) i izračunali postoji li razlika u raspodjeli IL-1 α rs1800587 genotipova između 395 bolesnika s AB i 250 ispitanika s MCI (Culjak i sur., 2020). Naši rezultati su na povećanom uzorku (N = 645 ispitanika) opet potvrdili da nema značajne povezanosti između između IL-1 α rs1800587 polimorfizma i AB (Culjak i sur., 2020).

Neke su studije pronašle značajnu povezanost IL-1 α rs1800587 polimorfizma i AB (Qin i sur., 2012; Combarros i sur., 2002, 2003; Hua i sur., 2012; Zhang i sur., 2017). Te studije upućuju da je T alel rizičan za razvoj AB (Combarros i sur., 2002, 2003). Pronađeno je da se T alel češće pronalazi u ispitanika bijele rase s AB prema kontrolnim ispitanicima (Dong i sur., 2017). Naime, smatra se da najveći rizik za razvoj AB imaju nosioci TT genotipa obzirom na IL-1 α rs1800587 polimorfizam i to je potvrđeno i u dvije meta-analize (Qin i sur., 2012; Hua i sur., 2012). Hayes i suradnici (2014) su pokazali da je aktivnost mikroglija povećana kod bolesnika s alelom T IL-1 α rs1800587, osobito kad je prisutan i rizičan alel ϵ 4 za apolipoprotein APOE. Smatra se da polimorfizam IL-1 α rs1800587 ima učinak na transkripciju gena IL-1 α i na sintezu proteina, te bi nosioci T alela pokazali prekomjernu ekspresiju protuupalnih citokina i neuroupale (Wei i sur., 2007). Isto je potvrdila i studija o povezanosti alela T s razvojem AB (Combarros i sur., 2002), a također i meta-analiza temeljena na 32 studije koja zaključuje da su veći rizik od razvoja AB imali bolesnici s genotipom TT (Qin i sur., 2012). Ovi nalazi upućuju da bi polimorfizam IL-1 α mogao biti čimbenik rizika za AB u bijeloj populaciji, što nije

potvrđeno u nekim drugim istraživanjima (Yildiz i sur., 2015). Istraživanje provedeno na kineskoj populaciji, upućuje da su nosioci CT genotipa ili T nosioci imali značajno povećan rizik za razvoj AB od nosioca CC genotipa (Zhang i sur., 2017). Meta-analiza o genskim polimorfizmima interleukina i rizika od AB pokazala je da je polimorfizam IL-1 α rs1800587 povezan s povećanim rizikom od AB u bijeloj populaciji, dok u azijskoj populaciji nije čimbenik rizika za razvoj AB (Mun i sur., 2016). Ta je analiza pokazala na ogromnom broju podataka (N = 8641 AB i N = 14 214 kontrola) povezanost IL-1 α rs1800587 polimorfizma i rizika od AB, no detaljne analize su utvrdile da je taj učinak značajan u tri genetska modela – (CC vs. TT), dominantnom modelu (TT/CT vs. CC) i recesivnom modelu (TT vs. CC/CT), dok se kod heterozigotnog modela (CC vs. TC) taj polimorfizam nije pokazao značajan kao rizik za razvoj AB. Dakle, ti nalazi upućuju da je gen IL-1 α kandidat za osjetljivost na AB u osoba bijele rase. Studije pokazuju da je iznimno važno usko definirati skupine ispitanike, jer je pronađeno da se C/T heterozigotni genotip može češće utvrditi kod ispitanika s AB koji pokazuju tešku depresiju prema nosiocima drugih genotipova obzirom na IL-1 α rs1800587 i to nakon što su rezultati kontrolirani za zbunjujuće varijable kao što su dob, trajanje bolesti i kognitivno propadanje (Serretti i sur., 2009).

Naši rezultati nisu potvrdili da je polimorfizam gena IL-1 α rs1800587 povezan s AB ili MCI. Genetski i okolišni čimbenici kao što su etnička pripadnost, spol, dob, prehrana, različite faze AB i MCI, razlike u dijagnostičkim potpupcima, interakcija s drugim genima, mogu imati utjecaj na nedosljednost različitih studija, stoga su potrebna daljnja istraživanja za potvrdu ili odbacivanje povezanosti između polimorfizma IL-1 α rs1800587 i rizika od AB.

5.4.4. Polimorfizam gena IL-1 α rs1800587 i kognitivni simptomi

Rezultati naše studije nisu utvrdili značajnu povezanost između polimorfizma gena IL-1 α rs1800587 s kognitivnim simptomima niti u ispitanika s MCI, niti u bolesnika s AB. Naime, u našoj studiji nije bilo značajnih razlika u broju bodova postignutih na MMSE testu između bolesnika s AB, nosioca TC, CC ili TT genotipova obzirom na IL-1 α rs1800587. Također, nisu utvrđene značajne razlike u broju bodova na MMSE testu između ispitanika s MCI nosioca TC, CC ili TT genotipova. Ti su rezultati bili sukladni rezultatima dobivenim Testom crtanja sata. Naime, nisu utvrđene značajne razlike u broju bodova postignutih na Testu crtanja sata između bolesnika s AB, nosioca CC, CT i TT genotipa, kao niti kod ispitanika s MCI obzirom na CC, CT i TT genotip IL-1 α rs1800587. Naša je studija usklađena s rezultatima velike populacijske studije koja je uključila ispitanike kardiovaskularne studije zdravlja i pratila gene za IL-1 α ,

IL-1 β , te gen za IL-1RN (receptor antagonist) povezane s upalnim odgovorom i istraživala njihovu povezanost s kognitivnim propadanjem mjerenom kroz 7 godina (Benke i sur., 2011). Studija nije utvrdila nikakvu povezanost IL-1 α rs1800587 s mjerama globalne kognicije ili brzine procesiranja na velikom broju ispitanika bijele rase ili afričko-američkog podrijetla. Utvrdili su značajnu povezanost s drugim SNPovima na genu IL1RN u bijele rase (rs17042917; rs4251961; rs931471), te na genu za IL-1 β u Afroamerikanaca (rs1143627; rs1143634). Ista studija nije utvrdila niti bilo kakve haplotipske kombinacije koje bi bile povezane s kognitivnom propadanjem praćenim longitudinalno (Benke i sur., 2011). Autori su zaključili da su genetske varijante IL1 gena uključene u urušavanje kognicije izazvane s upalom (Benke i sur., 2011). U studiji koja je istražila ispitanike sa 80 i više godina o utjecaju polimorfizma rs1800587 gena IL-1 α na demenciju, nije bilo značajne razlike u rezultatima MMSE testa između nosioca C ili T alela (Albani i sur., 2012). IL-1 sustav je važan za normalno kognitivno funkcioniranje (Yirmiya i sur., 2011).

S druge strane, heterozigoti C/T imali su jaču depresiju u usporedbi s nosiocima drugih genotipova (Seretti i sur., 2009). Nasuprot našim i tim rezultatima, druga studija koja je istraživala moguću povezanost IL-1 α rs1800587 i kognitivnih sposobnosti na starijim zdravim kineskim ispitanicima bez demencije i bez depresije je pokazala kako je IL-1 α rs1800587 značajno povezan s brojem bodova koje mjere kognitivne sposobnosti (Wang i sur., 2013). Naime, nosioci T alela su u odnosu na nosioce CC genotipa imali značajno veći broj bodova na skalama koje mjere dugoročno sjećanje, orijentaciju, vizualne konstrukcije i fluentnost (Wang i sur., 2013). Ta je studija također pokazala da je T alel IL-1 α rs1800587 povezan s boljom kognitivnom funkcijom u starijih osoba, no nije povezan s depresijom ili usamljenošću kod starijih muškaraca bez demencije, već predstavlja zaštitni čimbenik kognitivne funkcije (Wang i sur., 2013). Razlike u rezultatima između naših studija mogu se objasniti u razlikama u etničkoj pripadnosti (žuta vs. bijela rasa) te u razlikama u dijagnozama, jer je naša studija uključila ispitanike s MCI i AB dok je ova studija uključila ispitanike bez demencije i bez depresije (Wang i sur., 2013). Nadalje, otkrivena je snažna povezanost između genotipa T/T IL-1 α i pojave AB prije 65. godina života, pri čemu nosioci ovog genotipa pokazuju simptome bolesti 9 godina ranije od nosioca C/C (Grimaldi i sur., 2000), što upućuje da je prisutnost T alela povezana s ranijim kognitivnim propadanjem. Rezultati MMSE bili su značajno niži kod bolesnika koji su nosili alel T u IL-1 α rs1800587, što upućuje da je to rizični genotip koji može predstavljati genetske biomarkere progresije bolesti (Babic Leko i sur., 2019). Povišene koncentracije IL-1 α značajno su povezane s incidencijom demencije tijekom 2,5 godine praćenja kod korejskih bolesnika (Kim i sur., 2018). Upala je važan mehanizam

demencije, ali je i dalje nejasno je li upalni odgovor povezan s pojavom demencije ili je posljedica demencije (Brünsgaard i Pedersen, 2003). Stanja kao što su depresija, infekcija, trauma i vaskularni događaji mogu ubrzati upalne procese te dovesti do imunološke senzibilizacije, što može ubrzati kognitivno oštećenje (Kim i sur., 2018). Važno je utvrditi točnu funkciju različitih citokina u napredovanju AB, jer citokini imaju značajnu ulogu u razvoju demencije, međutim u nekim se slučajevima pokazuje i njihov zaštitni učinak (Zhang i Jiang, 2015).

Iako je polimorfizam gena IL-1 α rs1800587 bio povezan s AB, podatci o njegovoj povezanosti s kognitivnim simptomima nisu ujednačeni.

5.4.5. Povezanost koncentracije IL-1 α i polimorfizma gena IL-1 α rs1800587 kod ispitanika s Alzheimerovom bolesti i ispitanika s blagim kognitivnim poremećajem

Naše istraživanje nije otkrilo značajnu povezanost između koncentracije IL-1 α i polimorfizma gena IL-1 α rs1800587. Naime, koncentracija IL-1 α u serumu ispitanika nije se razlikovala unutar ispitanika s AB, ili unutar ispitanika s MCI, između nosioca CC, CT ili TT genotipova obzirom na IL-1 α rs1800587. Koncentracija IL-1 α u serumu nije se razlikovala kada su ispitanici s AB ili ispitanici s MCI bili podijeljeni na nosioce TT, TC i CC genotipa obzirom na IL-1 α rs1800587. U tim smo izračunima samo potvrdili već otprije utvrđene rezultate da postoje značajne razlike u koncentraciji IL-1 α u serumu između ispitanika s AB i ispitanika s MCI. Naime, nosioci TC genotipa s AB imali su značajno niže koncentracije IL-1 α u serumu nego nosioci TC genotipa s MCI. Sukladno tom nalazu, ispitanici s AB, nosioci CC genotipa s obzirom na IL-1 α rs1800587 imali su značajno nižu koncentraciju IL-1 α u serumu nego nosioci CC genotipa s MCI. Međutim, razlike u koncentraciji koje bi bile povezane s odgovarajućim genotipom nismo utvrdili. Iako se smatra da je IL-1 sustav pojačano eksprimiran u SŽS-u ispitanika s AB, te povezan s nastankom β -amiloidnih plakova i neurofibrilarnih snopića u mozgu (Sheng i sur., 2001; Griffin i sur., 2002), te da IL-1 α rs1800587 polimorfizam, smješten na 5' regulatornoj regiji, utječe na transkripciju gena IL-1 α i na sintezu proteina (Dominici i sur., 2002; Wei i sur., 2007), nisu pronađene razlike u koncentraciji IL-1 α u serumu ispitanika unutar bolesnika s AB, ili unutar ispitanika s MCI, podijeljenih na nosioce CC, CT ili TT genotipova obzirom na IL-1 α rs1800587. Smatra se da je T alel povezan s povećanom transkripcijom gena IL-1 α što dovodi do pojačane ekspresije pro-upalnih citokina i neuroinflamacije.

(Dominici i sur., 2002; Wei i sur., 2007). Iako se pretpostavlja da istraživani polimorfizam IL-1 α rs1800587 utječe na transkripciju gena IL-1 α i na sintezu proteina, te se očekuje da nosioci T alela imaju jaču ekspresiju protuupalnih citokina (Wei i sur., 2007), u našem istraživanju nismo potvrdili povezanost T alela i koncentracije IL-1 α u serumu ispitanika unutar ispitanika s AB, ili unutar ispitanika s MCI. Dostupni literaturni podatci ne daju podatke o istraživanjima koji bi uspoređivali koncentraciju IL-1 α u ispitanika s AB i MCI, obzirom na nosioce genotipa IL-1 α rs1800587. Postoje samo oprečni in vitro nalazi. Naime, kod mononuklearnih stanica stimuliranih s lipopolisaharidima ili kod linija stanica humanih astrocita, pokazano je da je alel T IL-1 α rs1800587 bio povezan s većom transkripcijom IL-1 α gena i povećanom produkcijom proteina (Dominici i sur., 2002; Wei i sur., 2007). Oprečno tim rezultatima, in vitro nalazi pokazuju da je kod preadipocita CC konstrukt pokazao značajan porast razine luciferazne aktivnosti u odnosu na TT konstrukt, upućujući na smanjenu transkripciju kod T nosioca (Um i sur., 2003). S druge strane kod kožnih fibroblasta nisu utvrđeni značajni učinci IL-1 α rs1800587 na transkripcijsku aktivnost i procesiranje prekursora IL-1 α (Kawaguchi i sur., 2007).

Dakle, slično rezultatima studije Kawaguchi i suradnika (2007) i suprotno rezultatima drugih in vitro studija (Dominici i sur., 2002; Wei i sur., 2007), naši rezultati nisu utvrdili značajan utjecaj IL-1 α rs1800587 na koncentraciju IL-1 α u serumu. Pretpostavljamo da bi buduće studije koje bi uključile veći broj ispitanika mogle pronaći povezanost IL-1 α rs1800587 s koncentracijom IL-1 α u serumu kod bolesnika s AB i ispitanika s MCI.

5.5. Citokin TNF- α

5.5.1. Koncentracija TNF- α u serumu ispitanika s Alzheimerovom bolešću i ispitanika s blagim kognitivnim poremećajem

Sukladno podacima u literaturi (Forlenza i sur., 2009) o povećanoj koncentraciji TNF- α u krvi bolesnika s AB, naše istraživanje je pokazalo da su bolesnici s AB imali značajno povišene vrijednosti koncentracije TNF- α u perifernoj krvi prema ispitanicima s dijagnozom MCI. Na koncentraciju TNF- α u krvi nisu utjecali spol, dob i rezultati MMSE testa ili Testa crtanja sata. Istraživanje koje je napravljeno na turskoj populaciji bilo je sukladno našim rezultatima i potvrdilo je da je koncentracija TNF- α u serumu bolesnika s AB bila značajno povećana u odnosu na kontrolnu zdravu skupinu (Demirci i sur., 2017). Naši se rezultati slažu i s rezultatima studije na kineskim ispitanicima, koja je pokazala povišene vrijednosti TNF- α u serumu

bolesnika s AB prema vrijednostima u kontrolnoj skupini (Yang i sur., 2009). Ti svi nalazi (naši i citirani iz literature) upućuju na zaključak o povećanim proupalnim citokinima, uključujući i TNF- α , u CSFu ili u perifernoj krvi u osoba s AB (Brosseron i sur., 2014). Studija koja se bavila aktiviranjem mikroglia, upućuje da se TNF- α kronično oslobađa tijekom AB, što je potaknuto aktiviranim mikroglia, neuronima i astrocitima (McAlpine i Tansey, 2008). Istraživanja opisuju povišene koncentracije TNF- α u biološkim tekućinama tijekom starenja, kod ispitanika s MCI i kod bolesnika s AB (Brosseron i sur., 2014). Smatra se da su koncentracije TNF-a u perifernoj krvi više u AB u odnosu na pojedince bez kognitivnih smetnji (Park i sur., 2020). TNF- α povećava proizvodnju drugih proupalnih citokina, poput IL-1, IL-6 i IL-8, koji mogu sudjelovati u razvoju kronične upale, ako nisu uravnoteženi protuupalnim citokinima (npr. IL-10) (Neta i sur., 1992). Khemka i suradnici ističu da su u studiji na bolesnicima koji imaju AB s depresijom, serumske koncentracije TNF-a bile dvostruko više u usporedbi s kontrolnom skupinom (Khemka i sur., 2014). Postoje i drugačiji rezultati, te studija o povezanosti TNF- α i AB u 13 članaka upućuju na povišenu, smanjenu ili nepromijenjenu koncentraciju TNF- α u AB u odnosu na vrijednosti u kontrolnoj skupini (Brosseron i sur., 2014). Suprotno našim rezultatima postoji studija koja je imala za cilj istražiti mogu li povišene koncentracije citokina predvidjeti prelazak MCI u AB, a koja je pokazala da nije pronađena značajna razlika u koncentracijama TNF- α između bolesnika koji su razvili AB i ispitanika koji su zadržali dijagnozu MCI (Diniz i sur., 2010). Još jedno istraživanje potvrđuje proturječnosti u koncentracijama TNF- α i navodi da je kod 124 bolesnice s AB potvrđen trend povećanja vrijednosti koncentracija TNF- α perifernoj krvi u odnosu na kontrolnu zdravu skupinu, ali te razlike nisu bile značajne (Baranowska i sur., 2008). Iako se TNF- α često istražuje s naglaskom na njegovu ulogu u razvoju AB, podatci iz literature nisu sukladni. Neke su studije pokazale da dolazi do povećanog oslobađanja perifernog TNF- α u bolesnika s AB (Fillit i sur., 1991; Alvarez i sur., 2007; Baranowska-Bik i sur., 2008; Kim i sur., 2018; Bruunsgaard i sur., 1999; Kassner i sur., 2008; Zuliani i sur., 2007). Međutim, postoje i potpuno suprotni podatci koji upućuju da dolazi do smanjenog oslobađanja TNF- α kod bolesnika s AB prema kontrolnim ispitanicima (Alvarez i sur., 1996; Kim i sur., 2011; Ray i sur., 2007). Osim toga, u literaturi se prikazuje i nedostatak bilo kakve povezanosti periferne koncentracije TNF- α s AB (Bjorkqvist i sur., 2012; Marksteiner i sur., 2011). Razlike među rezultatima studijama se možda mogu objasniti time da je veći dio studija usporedio koncentraciju TNF- α između bolesnika s AB i zdravih ispitanika. Postoje podatci iz literature koji pokazuju da nema značajnih razlika u perifernoj koncentraciji TNF- α između bolesnika s AB i ispitanika s MCI (Bermejo i sur., 2008), što je suprotno našim rezultatima. Međutim, mi smo usporedili koncentraciju TNF- α

između bolesnika s AB i ispitanika s MCI, i pokazali da je ta koncentracija značajno viša u bolesnika s AB u odnosu na ispitanike s MCI. Noviji rezultati su sukladni našim rezultatima (King i sur., 2018). Pokazano je (King i sur., 2018) da je viša koncentracija TNF- α u plazmi povezana s težim kognitivnim oštećenjem, jer su ispitanici s MCI imali niže koncentracije TNF- α u plazmi u odnosu na bolesnike s AB, i taj smo nalaz i mi potvrdili u ovoj studiji. Osim povišene koncentracije TNF- α u plazmi, bolesnici s AB su imali i povećane vrijednosti i drugih i proupalnih i protuupalnih citokina (interleukin IL-1ra, IL-4, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-15) prema kontrolnim ispitanicima bez demencije (Taipa i sur., 2019). Smatra se da se TNF- α tijekom razvoja AB neznatno, ali postojano povećava, ne samo u CSF-u, već i u krvi. Osim stalnog porasta, postoje mogućnosti da pojedinci s povišenom koncentracijom ovih citokina imaju veći rizik za razvoj AB ili da podskupine bolesnika s AB pokazuju povišene serumske koncentracije TNF- α , npr. pacijenti koji pate od neuroupane uz neurodegenerativne procese (Brosseron i sur., 2014).

U posljednja tri desetljeća, sve veći broj fizioloških i štetnih funkcija pripisan je signalizaciji TNF- α u SŽS-u (Probert, 2015). TNF- α i njegovi receptori reguliraju mnoštvo fizioloških funkcija u tijelu, uključujući imunološki nadzor, imunološke reakcije u borbi protiv mikrobnih infekcija, indukciju stanične smrti, uklanjanje tumorskih stanica, te u alergijskim reakcijama (Clark i sur., 2010). Saznanja stečena u posljednjim desetljećima o sintezi i fiziopatološkim ulogama TNF-a mogu biti korisna u kliničkim ispitivanjima u svrhu moduliranja koncentracije TNF-a ili signalizacije i smanjenja neuropatologije AB. Istraživanja na životinjama i na ljudima upućuju da terapijske intervencije u cilju smanjenja signalizacije TNF-a mogu djelovati na usporavanje napredovanja AB (Decourt i sur., 2017). Sve veći broj istraživanja upućuje na proupalne citokine kao pojačivače patologije AB (Heneka i O'Banion, 2007). Nekoliko epidemioloških studija upućuje na usporavanje AB kod osoba koje uzimaju nesteroidne protuupalne lijekove najmanje dvije godine prije pojave simptoma (McGeer i McGeer, 2013), no ti nalazi nisu potvrđeni u randomiziranoj studiji (Aisen i sur., 2003). Klinička ispitivanja nisu otkrila kognitivna poboljšanja u bolesnika s AB i stoga je malo vjerovatno da bi primjena samo protuupalnih lijekova mogla biti dovoljna za liječenje AB nakon pojave kognitivnih simptoma (Jaturapatporn i sur., 2012). Osim toga, dugoročna upotreba protuupalnih lijekova može izazvati štetne posljedice na gastrointestinalni i nefrološki sustav, što posebno ograničava upotrebu tih lijekova kod bolesnika s AB (Harirforoosh i sur., 2013). Kronična upala je ključna u razvoju neuropatologije AB i pridružene demencije. Iz toga proizilazi da je razvijanje terapijskih intervencija za moduliranje upale jedna od opcija liječenja AB, a zbog svoje

proupalne uloge, TNF- α je važna terapijska meta. Ti podatci zahtijevaju daljnja klinička istraživanja uz oprez da se inhibiranje TNF- α provodi na blagoj i umjerenoj razini da se ne bi izazvale štetne posljedice usljed djelovanja na fiziološku ulogu TNF- α u SŽS-u (Decourt i sur., 2017).

Naše je istraživanje pokazalo da je koncentracija TNF- α u krvi bolesnika s AB povećana prema koncentraciji TNF- α u ispitanika s MCI i taj je nalaz sukladan teoriji o neuroupalnoj podlozi AB.

5.5.2. Koncentracija TNF- α i kognitivni simptomi

U našoj studiji koncentracija TNF- α nije bila značajno povezana s brojem bodova na skalama MMSE i Testu crtanja sata, niti kod ispitanika s AB niti kod ispitanika s MCI. U skladu s time, regresijska analiza nije potvrdila da bi dob mogla imati prediktivnu vrijednost na koncentraciju TNF- α u serumu ispitanika s AB i MCI. Nije utvrđena niti povezanost između koncentracije TNF- α u plazmi i progresije AB (Taipa i sur., 2019). King i suradnici (2018) ističu da su povećane koncentracije TNF- α u plazmi povezane s jače izraženim kognitivnim urušavanjem, jer su pronađene smanjene koncentracije TNF- α u ispitanika s MCI prema bolesnicima s AB, dok su drugi citokini (IL-10, IL-1 β , IL-4 i IL-2) bili povišeni u ispitanika s MCI prema ispitanicima s AB. U studiji koja je istraživala koncentraciju citokina u bolesnika s AB i vaskularnom demencijom nije bilo značajne povezanosti između koncentracije TNF- α i rezultata MMSE testa, niti kod bolesnika s AB, niti kod bolesnika s vaskularnom demencijom (Uslu i sur., 2012). Slične rezultate navodi i studija o serumskim koncentracijama citokina u dementnih bolesnika gdje nije utvrđena povezanost između koncentracije TNF- α i MMSE kod bolesnika s AB, niti kod bolesnika s vaskularnom demencijom (Yasutake i sur., 2006).

Nasuprot tim nalazima, kod bolesnika koji su razvili drugu po učestalosti neurodegenerativnu bolest, Parkinsonovu bolest, i depresiju, povišene koncentracije TNF- α bile su povezane s kognitivnim poteškoćama, težim simptomima depresije i općenito slabijim funkcioniranjem (Menza i sur., 2010). U toj je studiji, za razliku od naše, TNF- α bio značajno povezan s mjerama kognicije. Naime, povećana koncentracija TNF- α bila je značajno povezana s lošijim kognitivnim funkcioniranjem. Smatralo se da je povećana koncentracija TNF- α doprinijela lošijoj kogniciji u depresivnih bolesnika s Parkinsonovom bolesti (Menza i sur., 2010). Čini se da povećana koncentracija TNF- α možda dovodi do jezičnih poremećaja te poteškoća u egzekutivnom funkcioniranju kod bolesnika s Parkinsonovom bolesti (Menza i sur., 2010).

TNF- α je bio povezan s kognitivnim propadanjem i demencijom u različitim studijama koje su uključile osobe s normalnim procesom starenja i kliničke populacije s AB i vaskularnom demencijom (Zuliani i sur., 2007). Koncentracija TNF- α bila je značajno povišena kod starih u odnosu na mlađe ispitanike (Bruunsgaard i sur., 1999). Povišeni sistemski TNF- α povezan je s dvostrukim porastom simptoma karakterističnih za bolesničko ponašanje, uključujući apatiju, anksioznost, depresiju i uznemirenost (Holmes i sur., 2011). Literaturni podatci upućuju da je glavni depresivni poremećaj povezan s povišenom koncentracijom serumskih imunoloških medijatora, uključujući i TNF- α (Bortolato i sur., 2015). S druge strane, u nedavno provedenoj meta-analizi o perifernim koncentracijama proupalnih markera, periferne koncentracije TNF- α nisu bile značajno povećane u starijih bolesnika s depresijom niti u bolesnika s AB (NgA i sur., 2018).

Studija provedena na tajvanskoj populaciji upućuje da su serumske koncentracije TNF- α u korelaciji s kognitivnom funkcijom u bolesnika s AB (Huang i sur., 2013). Podatci iz istraživanja provedenog na Azijskoj populaciji, kod korejskih ispitanika, pokazuju da su serumske koncentracije proupalnih citokina TNF- α i IL-6 negativno i pozitivno korelirane s rezultatima MMSE testa (Kim i sur., 2017). Slično istraživanje provedeno na norveškoj populaciji nije pronašlo povezanost između povećane koncentracije markera upale, među kojima je i TNF- α i rezultata MMSE testa (Hazen i sur., 2020).

U kliničkoj populaciji bolesnika s AB, utvrđeno je da su sistemski upalni događaji povezani s bržim padom kognitivnih funkcija tijekom 6 mjeseci, jer su ti pacijenti imali povišene koncentracije TNF- α i to je bilo povezano s padom kognitivnih sposobnosti tijekom razdoblja promatranja od 6 mjeseci. Ispitanici koji su imali nisku razinu serumskog TNF- α tijekom ispitivanja nisu pokazali kognitivni pad tijekom razdoblja od 6 mjeseci (Holmes i sur., 2009). Čini se da kod ispitanika s AB kombinacija dva biomarkera, koncentracije TNF- α i IL-7 uz Test crtanja sata, može napraviti biomarkersko-kognitivni profil koji je vrlo precizan u otkrivanju prisutnosti AB čak i u vrlo ranoj fazi (Edwards i sur., 2014). Studija provedena na maloj skupini bolesnika u 6-mjesečnom istraživanju perispinalne primjene etanercepta (lijeka koji je biološki inhibitor TNF- α), rezultirala je značajnim poboljšanjem standardnih mjera za kogniciju, a između ostalih i poboljšanjem rezultata MMSE testa (Tobinick i sur., 2006). Nadalje, klinički slučaj bolesnika oboljelog od AB, pokazuje značajno kognitivno poboljšanje tijekom studije nakon primjene anti-TNF- α terapije (Camargo i sur., 2015). Naime, kod tog bolesnika je broj bodova na MMSE testu tijekom studije porastao za 2 boda (Camargo i sur., 2015).

U animalnih modela povećana razina TNF- α bila je povezana s akutnim pogoršanjem kognicije i povećanim kinetozama, no to je bilo potvrđeno u životinja s progresivnom neurodegeneracijom (Hennessy i sur., 2017). Autori smatraju da je takav odgovor nastao radi sistemske upale i pojačane produkcije proupalnih citokina u SŽS-u te da sistemska primjena TNF- α povećava neuropalu u hipokampusu i hipotalamusu (Hennessy i sur., 2017).

Svi ti nalazi govore u prilog tome da je urušavanje kognicije povezano s povećanom razinom TNF- α . U našoj studiji mi smo to pokazali kod ispitanika s AB koji su imali povišenu koncentraciju TNF- α u serumu prema ispitanicima s MCI, no taj se nalaz nije potvrdio kada smo provjeravali kognitivno urušavanje sa skalama MMSE i Testom crtanja sata.

5.5.3. Povezanost polimorfizma gena TNF- α rs1800629 i Alzheimerove bolesti

U našem istraživanju nismo otkrili značajnu razliku u frekvenciji genotipova TNF- α rs1800629 između ispitanika s AB i ispitanika s MCI. Kako bi potvrdili ili opovrgli taj rezultat o nedostatku povezanosti između TNF- α rs1800629 polimorfizma i AB, prikupili smo sve ispitanike hrvatskog porijekla s AB i MCI iz drugih protokola i naših prijašnjih studija (Babic Leko i sur., 2020). Na tom povećanom broju ispitanika (395 bolesnika s AB i 250 ispitanika s MCI) smo ponovno izračunali postoji li razlika u raspodjeli TNF- α rs1800629 genotipova između ispitanika s AB i MCI (Culjak i sur., 2020). Usprkos povećanom broju ispitanika (N = 645), potvrdili smo da nema značajne povezanosti između između TNF- α rs1800629 polimorfizma i AB (Culjak i sur., 2020). Naime nisu pronađene značajne razlike u raspodjeli genotipova TNF- α rs1800629 (AA, AG i GG) ili A i G alela između bolesnika s AB i ispitanika s MCI, i ti su rezultati usklađeni s drugima iz literature (Babic Leko i sur., 2020). Sukladno našim rezultatima nije utvrđena značajna povezanost polimorfizma TNF- α rs1800629 i rizika od AB u studiji koja je uključila 533 ispitanika s AB i 713 zdravih kontrolnih ispitanika (Flex i sur., 2014). Nedostatak povezanosti između polimorfizma TNF- α rs1800629 i AB u skladu je s većinom istraživanja koja upućuju kako nema značajne povezanosti između polimorfizma TNF- α rs1800629 i rizika od AB (Manoochehri i sur., 2009). Meta-analiza koja je uključivala 1513 ispitanika s AB i 1907 zdravih kontrolnih ispitanika nije utvrdila povezanost između polimorfizma gena TNF- α rs1800629 i AB (Di Bona i sur., 2009). Sukladno rezultatima našeg istraživanja, nije pronađen značajan utjecaj polimorfizma gena TNF- α rs1800629 na osjetljivost za razvoj AB (Qidwai i Khan, 2011). Najveći dio rezultata iz literature je sukladan našim rezultatima i nije pronađena značajna povezanost polimorfizma TNF- α rs1800629 i rizika za razvoj AB (Di Bona i sur., 2009; Laws i sur., 2005; Flex i sur., 2014; Ribizzi i sur., 2010;

Qidwai i Khan, 2011). Ove rezultate potvrđuje i istraživanje između bolesnika s AB i zdravih kontrolnih ispitanika, čiji rezultati upućuju da polimorfizam TNF- α rs1800629 nije čimbenik rizika ili zaštitni čimbenik u iranskoj populaciji (Manoochehri i sur., 2009).

Za razliku od podataka iz Di Bona studije (2009), meta-analiza koja je ispitanike podijelila prema etničkoj pripadnosti, pokazala je da polimorfizam TNF- α rs1800629 može predstavljati značajan čimbenik rizika za AB u istočnih Azijata, ali se smatra da ne povećava osjetljivost od razvoja AB u europskoj ili bliskoistočnoj populaciji (Lee i sur., 2015). Taj je nalaz sukladan našim rezultatima jer su u našoj studiji uključeni ispitanici hrvatskog porijekla bijele rase. U navedenom istraživanju se navodi da meta-analiza nije pokazala povezanost između alela A polimorfizma TNF- α rs1800629 i AB kada se promatraju svi ispitanici (Lee i sur., 2015). Međutim, nakon podjele prema etničkoj pripadnosti, meta-analiza je pokazala da je alel A bio značajno povezan s razvojem AB u istočnih Azijata, ali ne i u europskoj populaciji ili bliskoistočnoj populaciji (Lee i sur., 2015). U kineskih ispitanika utvrđena je veća frekvencija A alela u bolesnika s AB prema zdravim kontrolnim ispitanicima (Yang i sur., 2009, Wang i sur., 2015). Meta-analiza (Wang i sur., 2015) je također utvrdila da kod dominantnog modela postoji protektivni učinak A alela prema razvoju AB kod ispitanika bijele rase sjeverno europskog porijekla, te je zaključeno da TNF- α rs1800629 može biti povezan i s povećanim rizikom za razvoj AB u kineskih ispitanika i smanjenim rizikom za razvoj AB u sjevernoeuropskih ispitanika.

Iranska studija potvrđuje da polimorfizam TNF- α rs1800629 može utjecati na cerebralni upalni odgovor i može biti čimbenik rizika za razvoj AB (Ardebili i sur., 2011). Nadalje, studija provedena na talijanskoj populaciji upućuje na značajnu povezanost između simptoma AB s ranim početkom i polimorfizma TNF- α rs1800629 (Lio i sur., 2006). Za razliku od te studije mi smo u ovom istraživanju uključili bolesnike s AB s kasnim početkom bolesti. Osim tih istraživanja, navodi se da su kombinacija polimorfizama TNF- α rs1800629 i IL-6 rs1800795 (AC blok), te kombinacija TNF- α rs1800629/IL-10 rs1800896 ili IL-10 rs1800896 (AA blok) značajno povezane s povećanim rizikom za razvoj AB, što upućuje na zaključak da polimorfizam TNF- α rs1800629 pokazuje svoju funkciju preko interakcije s drugim genima (Vural i sur., 2009).

Iz svega slijedi da TNF- α rs1800629 može biti polimorfizam koji modificira razvoj AB u određenim etničkim skupinama (najčešće skupinama ispitanika azijskog porijekla) ili u

kombinacijama s drugim polimorfizmima, što zahtijeva daljnja istraživanja. Nekonzistentni rezultati između istraživanja su posljedica heterogenosti između istraživanih populacija, etničkih razlika, premalo uključenih bolesnika/ispitanika što dovodi do nedovoljnog broja ispitanika i posljedično premale statističke snage.

5.5.4. TNF- α rs1800629 i kognitivni simptomi

U našoj studiji nije pronađena značajna povezanost između TNF- α rs1800629 i kognitivnih simptoma. Naime, kada su ispitanici s AB ili s MCI bili podijeljeni u nosioce GG genotipa prema A nosiocima, nije pronađena značajna razlika u broju bodova na MMSE testu između ispitanika s AB, nosioca GG genotipa prema A nosiocima obzirom na TNF- α rs1800629. Također, nisu utvrđene značajne razlike u broju bodova na MMSE testu između ispitanika s MCI koji su bili nosioci GG genotipa prema A nosiocima. Također sukladno tim nalazima, nisu utvrđene značajne razlike u broju bodova na Testu crtanja sata kod nosioca GG vs. nosioca A u ispitanika s AB. Također, broj bodova na Testu crtanja nije se razlikovao između nosioca GG vs. nosioca A u ispitanika s MCI. Suprotno našim rezultatima, u studiji provedenoj na egipatskoj populaciji, bolesnici s AB, nosioci alela A obzirom na polimorfizam TNF- α rs1800629 su pokazali povećanu osjetljivost za razvoj AB, ali alel A također je bio značajno povezan s mlađom dobi početka AB, kao i s dužim trajanjem bolesti od nosioca alela G, kao i s funkcionalnim pogoršanjem među bolesnicima koji su imali teži oblik AB (Meramat i sur., 2015). Povezanost između polimorfizma TNF- α rs1800629 i kognitivnih simptoma utvrđena je u drugoj studiji na uzorku egipatskih bolesnika s AB, gdje je alel A bio značajno povezan s nižim brojem bodova na testu MMSE, u usporedbi s alelom G, označavajući teži oblik AB (Khalil i sur., 2015). Nadalje alel A bio je značajno povezan s nižim brojem bodova na Testu crtanja sata, u usporedbi s alelom G, označavajući teži oblik AB (Khalil i sur., 2015). U studiji o istraživanju povezanosti polimorfizma TNF- α rs1800629 s pojavom depresije, utvrđeno je da nosioci genotipa AA TNF- α rs1800629 povećavaju osjetljivost na depresiju u korejskoj populaciji (Jun i sur., 2003). Kognitivne sposobnosti su također istraživane u ovisnosti o polimorfizmima TNF- α rs1800629 u kombinaciji s polimorfizmom enzima ACE (Georgiopoulos i sur., 2017). U toj je studiji izračunat kombinirani genetski indeks TNF- α i ACE i kognitivno oštećenje, te je pronađeno da je kombinacija genotipova za oba gena (homozigoti GG za TNF- α i homozigoti DD za ACE) povezana s padom broja bodova na MMSE testu (Georgiopoulos i sur., 2017). Nosioci alela A TNF- α rs1800629 kod starijih osoba, pokazuju poremećaje u procesima pažnje (Gajewski i sur., 2013). Suprotno tome, A alel TNF- α rs1800629 je u studiji na bijeloj populaciji u starijih bolesnika (preko 65 godina), bio povezan

s boljom brzinom obrade informacija (Baune i sur., 2008). Studija na Brazilskoj populaciji ispitanika starijih od 75 godina s oštećenjem kognitivnih sposobnosti, izvješćuje da su nosioci alela A TNF- α rs1800629, povezani s boljim kognitivnim i funkcionalnim rezultatima (Fraga i sur., 2017). Nadalje utvrđen je značajno veći postotak nosioca GG genotipa TNF- α rs1800629 u studiji provedenoj na bolesnicima s depresijom (Cerri i sur., 2009). Suprotno ovome, meta-analiza o povezanosti polimorfizma TNF- α rs1800629 i depresije otkrila je da ovaj polimorfizam nije povezan s osjetljivošću na depresiju (Shin i sur., 2017).

Nasuprot patološkom starenju, samo nekoliko studija opisuje zdravo starenje i povezanost polimorfizma TNF- α rs1800629 i kognitivnih funkcija. Takve studije su značajne jer genetske razlike među starijim pojedincima mogu također biti uzrok većih varijacija u kognitivnom funkcioniranju tijekom starenja koje se povećavaju s godinama (Gajewski i sur., 2011). Postojeće studije upućuju da nosioci A alela TNF- α rs1800629 imaju ugroženu memoriju i motoričke funkcije, ali i mogućnost brže obrade podataka u usporedbi s GG genotipom (Baune i sur., 2008). Iako ove studije pokazuju povezanost TNF- α rs1800629 i kognicije u zdravom starenju, točna uloga ovog SNP-a kod zdravih starijih pojedinaca još uvijek nije potpuno razjašnjena (Gajewski i sur., 2013). U zdravih ispitanika istražen je utjecaj TNF- α rs1800629 na kogniciju (Beste i sur., 2010). Pokazano je da je taj polimorfizam značajno povezan s kognicijom jer su ispitanici, nosioci A alela imali bolje procesiranje pažnje prema nosiocima GG genotipa, dok su funkcije konfliktnog procesiranja bile smanjene u A nosioca prema G nosiocima (Beste i sur., 2010). Ti su rezultati uputili na različite učinke TNF- α rs1800629 na kognitivne procese u SŽS-u (Beste i sur., 2010). U slijedećoj studiji su isti autori (Beste i sur., 2011) proučavali povezanost TNF- α rs1800629 i procesiranje pogrešaka i inhibiciju odgovora, opet putem evociranih potencijala u zdravih bijelih ispitanika. Naime, nosioci AA i AG genotipa prema nosiocima GG genotipa su imali bolje rezultate kod inhibicije odgovora (dakle manji postotak lažnih alarma), ali također i lošiju kontrolu procesiranja pogrešaka tj. usporavanja nakon pogrešaka, dok su nosioci GG genotipa prema A nosiocima imali upravo suprotne odgovore (lošije rezultate kod inhibicije odgovora) i povećano procesiranje pogrešaka (Beste i sur., 2011). Tijekom starenja, procesi pažnje kod starijih osoba često značajno opadaju, upućujući na deficite pamćenja (Beste i sur., 2010). Budući da je kod zdravih starijih osoba A alel TNF- α rs1800629 bio povezan s boljim procesima pažnje, taj bi učinak mogao biti objašnjen time da TNF- α olakšava glutamatergički neuronski prijenos koji potiče procese pažnje (Beste i sur., 2012). Sve to upućuje da TNF- α ima važnu ulogu u integritetu neuronske

mreže u okcipitalnom korteksu, području koje je od presudnog značaja za vizualnu pažnju (Carrasco, 2011).

Ti su rezultati pokazali kako se utjecaj TNF- α rs1800629 na kognitive procese u SŽS-u razlikuje ovisno o primijenjenom testu kojim se mjeri kognitivna sposobnost, i ovi su rezultati dobiveni na mladim zdravim dobrovoljcima, suprotno starijim osobama s AB i MCI koje su bile uključene u našu studiju, te i to može biti uzrok razlika u dobivenim rezultatima.

5.5.5. Povezanost koncentracije TNF- α i polimorfizma gena TNF- α rs1800629 u ispitanika s Alzheimerovom bolesti i ispitanika s blagim kognitivnim poremećajem

Prema rezultatima našeg istraživanja, koncentracija TNF- α nije se značajno razlikovala između ispitanika s AB i ispitanika s MCI, kada su oni bili podijeljeni na nosioce genotipova AA, GA ili GG TNF- α rs1800629. Značajne razlike u koncentraciji bile su povezane samo s dijagnozama AB i MCI, dok je ta koncentracija bila slična između nosioca AA, GA ili GG genotipova TNF- α rs1800629 unutar ispitanika s AB. Također, nije bilo razlike u koncentraciji TNF- α između nosioca AA, GA ili GG genotipova TNF- α rs1800629 unutar ispitanika s MCI. Mi smo utvrdili da nosioci GG genotipa obzirom na TNF- α rs1800629 kod bolesnika s AB imaju značajno povišenu koncentraciju TNF- α prema vrijednostima kod nosioca GG u ispitanika s MCI. Također, ispitanici s AB, A nosioci obzirom na TNF- α rs1800629, imali su značajno višu koncentraciju TNF- α nego ispitanici s MCI, nosioci A nosioci obzirom na TNF- α rs1800629.

Nema dostupnih podataka u studijama o koncentraciji TNF- α u bolesnika s AB ili MCI i njihovoj povezanosti s polimorfizmom TNF- α rs1800629. Međutim, postoje podatci o povezanosti ili nedostatku povezanosti koncentracije TNF- α s polimorfizmom TNF- α rs1800629 u drugim dijagnostičkim kategorijama. Neki podatci upućuju da TNF- α rs1800629 A alel ima veću transkripcijsku aktivnost u usporedbi s G alelom (Wilson i sur., 1993). Smatra se da je TNF- α rs1800629 funkcionalni polimorfizam jer se A alel povezuje s jačom transkripcijskom aktivnosti nego G alel i vjerojatno rezultira višom razinom TNF- α (Hajeer i Hutchison 2001; Wilson i sur., 1997).

Nedostatak ove povezanosti u našem istraživanju je u skladu s rezultatima dobivenim na bijeloj populaciji s infarktom miokarda, gdje polimorfizam TNF- α rs1800629 nije bio povezan s

razlikama u koncentraciji TNF- α u krvi (Bennet i sur., 2006). Studija provedena na iranskim bolesnicima s drugom dijagnozom (kronični hepatitis B), upućuje da je smanjena koncentracija TNF- α bila povezana s G alelom TNF- α rs1800629 (Heidari i sur., 2016). Podatci iz in vivo studija također upućuju na zaključak da i kod kultura stanica iz krvi ispitanika s multiplom sklerozom, niti visoka niti niska produkcija TNF nakon stimulacije lipopolisaharidima nije bila pod utjecajem TNF- α rs1800629 polimorfizma (Huizinga i sur., 1997).

Ti svi podatci sumarno upućuju (Qidwai i Khan, 2011) da su gen TNF- α i TNF- α polimorfizmi odgovorni za osjetljivost ili rezilijentnost na različite humane bolesti. Ekspresija gena TNF- α je kontrolirana pomoću različitih polimorfizama u promotorskoj regiji, ali i sa nekoliko različitih signalnih molekula ili nuklearnih čimbenika koji su u interakciji s promotorskom regijom za TNF- α ili i drugim elementima (El-Tahan i sur., 2016). Međutim, naši podatci i podatci iz literature (Bennet i sur., 2006; Heidari i sur., 2016; Huizinga i sur., 1997) upućuju na zaključak da nema značajne povezanosti između koncentracije TNF- α i polimorfizma TNF- α rs1800629, i to nije utvrđeno niti kod bolesnika s AB niti kod ispitanika s MCI.

5.6. Citokin IL-10

5.6.1. Koncentracija IL-10 u serumu ispitanika s Alzheimerovom bolesti i ispitanika s blagim kognitivnim poremećajem

Rezultati našeg istraživanja su pokazali da su ispitanici s AB imali značajno sniženu koncentraciju IL-10 u odnosu na grupu ispitanika s MCI. Naši su rezultati sukladni istraživanju provedenom na korejskim bolesnicima i kontrolnoj zdravoj skupini koje nije otkrilo razliku u koncentraciji IL-10 (Kim i sur., 2011). Niža koncentracija protuupalnog IL-10 odgovara hipotezi o neuroupali kao podlozi nastanka AB. Aktivacija i proizvodnja protuupalnog IL-10 od strane živčanih stanica nije potpuno razjašnjena (Gezen i sur., 2013). Neke studije upućuju na pozitivan učinak IL-10 na neurogenezu, dok druge upućuju na negativan učinak u patologiji AB (Kiyota i sur., 2012). Kontrola štetnih posljedica neuroupale u mozgu predstavlja jedno od najvažnijih pitanja u istraživanju mehanizama koji sudjeluju u procesu upale. Imunološke stanice SŽS-a, naročito mikroglia, putem aktivacije IL-10 pokušavaju suzbiti oštećenja (Lobo-Silva i sur., 2016). Smatra se da IL-10 nadzire aktivnost T stanica i utječe na fagocitozu i produkciju citokina u monocitima (perifernim makrofagima i mikrogliji u SŽS-u), te da kao antiupalni medijator suprimira upalni odgovor i smanjuje sintezu proupalnih citokina IL-1, IL-6, i TNF- α (Guillot-Sestier i sur., 2015; Vargas-Alarcón i sur., 2006). Prema tim nalazima,

povećana koncentracija IL-10 u AB, može predstavljati pokušaj imunog sustava da uspostavi ravnotežu koja je narušena oslobađanjem proupalnih citokina koji su povezani s pojačanim odlaganjem A β proteina u AB (D'Anna i sur., 2017). Promjena koncentracije IL-10 ovisi o fazi bolesti. Naši nalazi o smanjenoj koncentraciji IL-10 u bolesnika s AB prema ispitanicima s MCI su sukladni teorijama neuropale kao rizičnog čimbenika za razvoj AB. Neki autori predlažu IL-10 kao biomarker progresije tijekom AB (D'Anna i sur., 2017), i ti su nalazi u skladu s istraživanjem koje je izvijestilo da je IL-10 bio povezan s kliničkim pokazateljima o ozbiljnosti bolesti (Leung i sur., 2013). Ti su nalazi potvrđeni s nalazima koji pokazuju povećanu koncentraciju IL-10 u serumu i CSF-u ispitanika s AB u odnosu na kontrolne ispitanike (Angelopoulos i sur., 2008; Doecke i sur., 2012; Guillot-Sestier i sur., 2015). Suprotno našim rezultatima, istraživanje između ispitanika s teškim stadijem demencije u usporedbi s kontrolnom skupinom, nije pokazalo značajnu razliku u koncentraciji IL-10 (Bonotis i sur., 2008). Potvrđen je trend povećanja vrijednosti koncentracije IL-10 u perifernoj krvi bolesnika s AB u odnosu na kontrolnu zdravu skupinu, ali te razlike nisu bile značajne (Baranowska i sur., 2008). U našoj studiji koncentracija IL-10 nije bila pod utjecajem dobi, spola ili broja bodova na skalama MMSE ili Testu crtanja sata. Suprotno sniženoj koncentraciji IL-10 u naših bolesnika s AB, druge su studije pronašle povećanu koncentraciju IL-10 u dementnih osoba (Hamdan i sur., 2014; Angelopoulos i sur., 2008).

IL-10 je kao protuupalni mediator istaknut kao jedan od glavnih citokina povezanih s pojavom AB, jer se smatra da bi terapija koja povećava razinu IL-10 mogla biti potencijalna terapija za AB, budući da ovaj citokin djeluje na smanjenje amiloidnih plakova i protuupalnih molekula (Magalhães i sur., 2017). Taj je nalaz u skladu s ulogom IL-10 u suzbijanju i izlučivanju proupalnih citokina iz mikroglija, jer se pokreće polarizacija M2c povezana s deaktivacijom mikroglija (Bagynszky i sur., 2014).

Istraživanja o koncentraciji perifernih citokina pokazuju izrazito oprečne rezultate u različitim studijama. Studije koje uključuju upalne i proupalne citokine trebaju u budućnosti obuhvatiti velike populacijske skupine koje bi se usmjerile na istraživanje novih inhibitora citokina, a koji bi bili u mogućnosti uspostaviti ravnotežu između proupalne i protuupalne aktivnosti u AB. U dijagnostici AB, jedan biomarker u perifernoj krvi nije dovoljan da u potpunosti definira patofiziologiju AB. Međutim, više markera koji predstavljaju različite faze progresije bolesti pružili bi bolji uvid u ulozi biomarkera i razvoja AB (D'Anna i sur., 2017).

5.6.2. Koncentracija IL-10 i kognitivni simptomi

Koncentracija IL-10 u serumu ispitanika s AB ili MCI nije bila značajno korelirana s brojem bodova na skalama MMSE i Testu crtanja sata. U skladu s time, koncentracija IL-10 nije bila povezana s rezultatima postignutim na skalama za praćenje verbalnog pamćenja na velikom uzorku starije berlinske populacije (Tegeler i sur., 2016). Koncentracija IL-10 nije bila dobar pokazatelj egzekutivnih funkcija i brzine procesiranja, ali je bila povezana značajno s rezultatima postignutim na skalama za egzekutivno funkcioniranje i brzinu procesiranja (Tegeler i sur., 2016). Koncentracija IL-10 nije bila povezana s verbalnim pamćenjem u starijih ispitanika (Tegeler i sur., 2016). Taj je nalaz potvrđen s regresijskom analizom koja nije uočila da dob ima prediktivnu vrijednost na koncentraciju IL-10 u serumu ispitanika s AB i MCI (Tegeler i sur., 2016). Dakle ti nalazi upućuju da koncentracija IL-10 nije povezana s kognitivnim sposobnostima i to se pokazalo i kod ispitanika s AB i kod ispitanika s MCI.

Sukladno tom nalazu, koncentracija IL-10 nije bila povezana s kognitivnim poteškoćama u depresivnih bolesnika s Parkinsonovom bolesti (Menza i sur., 2010). Međutim, ima i suprotnih nalaza iz literature koji pokazuju da dolazi do značajnog porasta koncentracije IL-10 u osoba s AB s brzim kognitivnim propadanjem u odnosu na osobe s AB koji imaju sporije kognitivno oštećenje, a koje su praćene kroz godinu dana (Leung et al., 2013). Pretpostavljamo da različite faze bolesti u kojoj su ispitanici s AB mogu biti odgovorne za te različite nalaze iz literature. Smatra se da je povišena koncentracija IL-10 u plazmi ispitanika s MCI prema bolesnicima s AB (King i sur., 2018) pokazatelj povećane periferne neuroupale koja je karakteristična za ranu fazu MCI i koja se smanjuje s težinom bolesti. Kod zdravih starijih osoba povećan broj bodova na bateriji kognitivnih testova, koji upućuju na mogući razvoj MCI, i duže reakcijsko vrijeme je bilo povezano sa smanjenom koncentracijom IL-10 (Fabrègue i sur., 2016). Autori su istaknuli kako njihova studija pokazuje povezanost IL-10 i ponašanja, no također su njihovi rezultati potvrdili da ta povezanost ovisi o kognitivnom testu koji se upotrijebio u studiji (Fabrègue i sur., 2016).

Osim razlika u kognitivnom testiranju, razlike između tih i naših rezultata mogu se objasniti i razlikama u dijagnozama, jer je naša studija uključila ispitanike s AB i MCI dok je ta studija (Fabrègue i sur., 2016) uključila zdrave ispitanike, a isključila ispitanike s neurodegenerativnim bolestima. Kod transgeničnih mišjih modela je utvrđeno da IL-10 značajno poboljšava neurogenezu i prostornu orijentaciju (Kiyota i sur., 2012). S druge strane, pojačana ekspresija

IL-10 u animalnim modelima AB je među ostalim povećala taloženje A β i pogoršala kognitivne sposobnosti (Zheng i sur., 2016). Kod mišjeg APP transgeničnog modela povećana ekspresija IL-10 je dovela do povećane akumulacije A β i značajnog pogoršanja u ponašanju (Chakrabarty i sur., 2015).

Čini se da IL-10 u mozgu inhibira razvoj i napredovanje kroničnih neurodegenerativnih bolesti (Richwine i sur., 2009). To je potvrđeno u animalnim modelima, jer istraživanje na miševima pokazuje da je nedostatak IL-10 izazvao neuropalu i progresiju prionske bolesti (Thackray i sur., 2004). U studiji na transgeničnim miševima utvrđeno je da IL-10 značajno smanjuje neuropalu, poboljšava neurogenezu i poboljšava prostornu kognitivnu disfunkciju (Kiyota i sur., 2012). Dok su učinci IL-10 na ozljedu mozga i neke neurodegenerativne bolesti poznati, manje se zna o ulozi IL-10 u posredovanju komunikacije između perifernog imunološkog sustava i mozga tijekom infekcije i nije poznato ima li IL-10 ulogu u sprječavanju kognitivnih poremećaja koji su povezani s upalom (Richwine i sur., 2009). Smatra se da IL-10 modulira rani razvoj mozga i posljedično kognitivno funkcioniranje (Meyer i sur., 2006). Neravnoteža između proupalnih i protuupalnih citokina je važna kod AB (Magalhães i sur., 2017). Naime, postoji porast proizvodnje upalnih citokina od sedam do deset puta prema koncentraciji IL-10 kod bolesnika s AB u usporedbi s kontrolnim ispitanicima (Ma i sur., 2005). Nedavna istraživanja su pokazala da IL-10 posreduje i u razvoju depresivnog ponašanja, utječući na nekoliko simptoma povezanih s depresijom, a to su bespomoćnost, poremećaji spavanja i percepcija boli (Roque i sur., 2009).

Upravo stoga je predloženo da se uloga IL-10 treba nadalje istražiti u bolesnika s AB u kojima će se istovremeno istražiti i koncentracija IL-10 i IL-10 polimorfizmi (Zheng i sur., 2016), što je u našoj studiji učinjeno.

5.6.3. Povezanost polimorfizma gena IL-10 rs1800896 i Alzheimerove bolesti

U našem istraživanju ispitanici s AB i ispitanici s MCI imali su sličnu raspodjelu IL-10 rs1800896 genotipova i alela, što upućuje da IL-10 rs1800896 nije povezan s osjetljivošću za razvoj AB. Kako bi detaljnije proučili taj odnos, povećali smo skupine i provjerili povezanosti IL-10 rs1800896 s AB na velikom uzorku bolesnike hrvatskog porijekla s AB i MCI iz drugih protokola i naših prijašnjih studija (Babic Leko i sur., 2020; Culjak i sur., 2020). Nije utvrđena značajna razlika u raspodjeli IL-10 rs1800896 genotipova između 395 bolesnika s AB i 250 ispitanika s MCI (Culjak i sur., 2020). Sumarno, naši rezultati su potvrdili da između 645

ispitanika nije postojala značajna povezanost između između IL-10 rs1800896 polimorfizma i AB (Culjak i sur., 2020). Naime, nije bilo razlika u frekvenciji AA, AG i GG genotipova obzirom na IL-10 rs1800896 između bolesnika s AB i ispitanika s MCI, i ti su rezultati usklađeni s drugima iz literature (Babic Leko i sur., 2020).

Sukladno nedostatku povezanosti između IL-10 rs1800896 i AB, i druge su studije utvrdile da nema značajne korelacije između rizika za razvoj AB i IL-10 rs1800896 (Ma i sur., 2005; Bagnoli i sur., 2007; Kang i sur., 2015). Neke studije upućuju na zaključak da je spol važan čimbenik koji može utjecati na odnos između rizika za razvoj AB i IL-10 rs1800896 polimorfizma (Medway i sur., 2014). Međutim, spol nije bio značajno povezan s raspodjelom IL-10 rs1800896 genotipova (Culjak i sur., 2020). Naši su rezultati sukladni studiji na engleskoj populaciji gdje se u skupini bolesnika s AB i kontrolnoj skupini, u istraživanju rs1800871, rs1800896, rs1800872, rs1800893 i rs1800890, navodi da nijedan SNP nije povezan s AB (Culpan i sur., 2006). Taj je nalaz u skladu s rezultatima studije na njemačkoj populaciji koja nije utvrdila značajne razlike u alelnoj raspodijeli rs1800896, rs1800871 i rs1800872 između bolesnika s AB i kontrolne zdrave skupine (Depboylu i sur., 2003). Studija provedena na korejskoj populaciji o uključenosti alela povezanih s većom proizvodnjom proupalnih i nižom proizvodnjom protuupalnih citokina kod ispitanika s AB ili depresijom, nije pronašla značajnu povezanost između polimorfizma rs1800896 i AB ili kasne depresije (Kang i sur., 2015).

Dvije meta-analize (Di Bona i sur., 2012; Zhang i sur., 2015) su istražile značajnu vezu između IL-10 rs1800896 G alela i smanjenog rizika za razvoj AB u ispitanika europskog porijekla. Jedna je analiza (Zhang i sur., 2015) uključila 2 158 bolesnika s AB i 2 088 kontrola odnosno 12 studija slučaja/kontrole i pokazala značajnu povezanost, dok je druga meta analiza uključila 15 studija slučaja/kontrole i utvrdila samo marginalnu povezanost (Di Bona i sur., 2012). Nosioci alela A, što odgovara nižoj proizvodnji IL-10, imali su veći rizik za bolest od nosioca GG homozigota (Candore i sur., 2007). Te korelacije nisu potvrđene za azijsku populaciju (Zhang i sur., 2011). S time su suglasni nalazi kod ispitanika brazilskog porijekla, koji su, ako su bili nosioci GG genotipa obzirom na IL-10 rs1800896 imali značajno (za 40 %) manju šansu za razvoj AB od nosica drugih genotipova (Moraes i sur., 2013). Suprotno našim rezultatima, postoje i studije koje su pokazale značajnu povezanost između AB i IL-10 rs1800896 (Vural et al., 2009; Lio i sur., 2003; Zhang i sur., 2011; Ribizzi i sur., 2010; Di Bona i sur., 2012). Dostupni literaturni podatci objašnjavaju ulogu polimorfizma IL-10 i AB u kontekstu slabljenja neuroupale, kognitivne disfunkcije i neurodegeneracije (Magalhães i sur., 2017). Kod bolesnika s AB uočeno je značajno više alela A IL-10 rs1800896 i smanjena frekvencija genotipa GG

(Arosio i sur., 2004). Nadalje, istraživanje o prevalenciji polimorfizama rs1800896, rs1800871, rs1800872 i AB na talijanskoj populaciji potvrdilo je više alela A polimorfizma rs1800896 i manje genotipa GG rs1800896 u skupini bolesnika s AB u odnosu na kontrolnu skupinu (Arosio i sur., 2004; Lio i sur., 2003), odnosno smatra se da je prisustvo A alela kod osoba s AB povezano s rizikom za razvoj AB (Lio i sur., 2003). U istraživanju provedenom na turskoj populaciji utvrđeno je da su nosioci genotipa i nosioci alela A (AG + AA genotip) imali dvostruko veći rizik od nastanka AB (Vural i sur., 2009).

Nadalje, identificirana su dva rizična haplotipa (ATA i CTA) i četiri zaštitna haplotipa (ATG, CTG, ACG i CCG) u studiji provedenoj na meksičkoj populaciji koja je analizirala genotipske i haplotipske kombinacije polimorfizama IL-10 rs1800896, rs1800871 i rs1800872 (Vargas-Alarcón i sur., 2016). Neke studije upućuju na moguću specifičnu ulogu spola između rizika od AB i IL-10 rs1800896 (Medway i sur., 2014). U našem istraživanju spol nije značajno utjecao na učestalost genotipova IL-10 rs1800896.

Raspodjela genotipova i alela IL-10 rs1800896 razlikuju se u određenim populacijama (Guo i sur., 2012). Neki podatci iz studija upućuju da je polimorfizam IL-10 rs1800896 važan čimbenik rizika za AB. Međutim, sam mehanizam kako IL-10 može utjecati na neuroupalu, kognitivne disfunkcije i neurodegeneraciju nije potpuno jasan (Magalhães i sur., 2017).

5.6.4. Polimorfizam IL-10 rs1800896 i kognitivni simptomi

Utvrđili smo da nema značajne povezanosti između IL-10 rs1800896 i kognitivnih simptoma mjerenim skalom MMSE ili Testom crtanja sata kod ispitanika s AB ili kod ispitanika s MCI. Naime, nisu postojale značajne razlike u broju bodova postignutih na MMSE testu između ispitanika s AB, nosioca AA, GG ili GA genotipova, obzirom na IL-10 rs1800896. Također, nisu utvrđene značajne razlike u broju bodova na MMSE testu između ispitanika s MCI nosioca AA, GG ili GA genotipova. Slično tim rezultatima, nisu utvrđene značajne razlike u broju bodova na Testu crtanja sata između ispitanika s AB, nosioca AA, GG ili GA genotipova, obzirom na IL-10 rs1800896. Kada su ispitanici s MCI podijeljeni na nosioce AA, GG ili GA genotipove, obzirom na IL-10 rs1800896, nisu imali značajno različit broj bodova na Testu crtanja sata. Arosio i sur. (2010) su istražili raspodjelu genotipova i alela rs1800896 kod 138 ispitanika s MCI koji su podijeljeni u dvije skupine, ispitanici s oštećenjem pamćenja i ispitanici kojima je dijagnosticirano oštećenje u najmanje dvije kognitivne domene. U toj je studiji (Arosio i sur., 2010) istražena frekvencija genotipova IL-10 rs1800896 kod talijanskih

ispitanika s MCI i ispitanika s amnestičkim oblikom MCI te osobama s multiplim narušenim domenama kognicije. Pokazano je da nije bilo razlike u frekvenciji genotipova IL-10 rs1800896 između ispitanika s MCI i AB, odnosno između ispitanika s multiplim narušenim domenama kognicije i kontrolnih ispitanika (Arosio i sur., 2004; 2010). Učestalosti genotipa AA bile su slične u ispitanika s MCI s oštećenjem pamćenja i AB, dok su rezultati ispitanika s MCI s oštećenjem u najmanje dvije kognitivne domene bili slični kontrolnoj skupini (Arosio i sur., 2010). Ti se rezultati potvrdili da IL-10 rs1800896 nije povezan s kognitivnim urušavanjem i slični su našim rezultatima u kojima niti kod ispitanika s MCI niti kod ispitanika s AB nismo pronašli značajne razlike u kognitivnim simptomima kada su ispitanici bili podijeljeni na nosioce AA, GG ili GA genotipova, obzirom na IL-10 rs1800896. Sukladno našim rezultatima, IL-10 rs1800896 nije bio povezan s MCI, nego sa sindromom koji je preteča demencije, sindromom motornog kognitivnog rizika (Sathyan i sur., 2017). Budući da mi u našoj studiji nismo istraživali sindrom motornog kognitivnog rizika, ne možemo komentirati te rezultate. Kognitivno funkcioniranje može biti pod utjecajem IL-10 rs1800896, jer su u populacijskoj studiji na danskim ispitanicima rođenim 1905. godine (a gdje se pratilo preživljavanje u starijoj dobi) nositeljice genotipa GG IL-10 rs1800896 ženskog spola imale niže kognitivno funkcioniranje u usporedbi s nositeljicama genotipa AA i AG (Dato i sur., 2010). S druge strane, utvrđena je veća frekvencija genotipa AA kod bolesnika s amnestički blagim kognitivnim oštećenjem koji su napredovali u AB, prema ispitanicima koji su ostali klinički stabilni (Arosio i sur., 2010). U Parkinsonovoj bolesti, alel A je čimbenik rizika kognitivnog deficita u europskoj populaciji, dok kod kineskih bolesnika AA genotip IL-10 rs1800896 ima zaštitni učinak protiv kognitivnog opadanja (Nie i sur., 2013).

Iako je polimorfizam IL-10 rs1800896 povezan s razvojem AB, njegova povezanost s kognitivnim urušavanjem u AB te utjecaj na kognitivno funkcioniranje i neurodegeneraciju nisu još jasni ili detaljno istraženi (Magalhães i sur., 2017).

5.6.5. Povezanost koncentracije IL-10 i polimorfizma IL-10 rs1800896 u ispitanika s Alzheimerovom bolesti i ispitanika s blagim kognitivnim poremećajem

Rezultati našeg istraživanja nisu pokazali bilo kakvu značajnu razliku u koncentraciji IL-10 između ispitanika s AB ili MCI, podijeljenih obzirom na genotipove AA, GA ili GG obzirom na IL-10 rs1800896. Koncentracija IL-10 razlikovala se samo između dijagnostičkih skupina. Naime, pronađen je značajan porast koncentracije IL-10 kod ispitanika s MCI koji su bili nosioci AA genotipa prema koncentraciji IL-10 u serumu ispitanika s AB, nosiocima AA

genotipa. S time u skladu, značajno više koncentracije IL-10 utvrđene su kod ispitanika s MCI, nosioca GG genotipa, prema ispitanicima s AB, nosiocima GG genotipa. I kod nosioca GA genotipa, ispitanici s MCI su imali povećanu koncentraciju IL-10 u serumu prema ispitanicima s AB, nosiocima GA genotipa. Nadalje, nismo naišli na dostupne literaturne podatke o mogućoj povezanosti između koncentracije IL-10 i polimorfizma gena IL-10 rs1800896 u AB ili MCI. Pretpostavlja se da su polimorfizmi za gen IL-10 povezani s promijenjenom transkripcijom gena IL-10 te koncentracije IL-10 u plazmi (Ma i sur., 2005). Međutim, sukladno našim rezultatima, kod ispitanika s AB nije bilo značajne povezanosti između IL-10 rs1800896 i koncentracije IL-10 (Ma i sur., 2005). U skupini bolesnika s AB u odnosu na kontrolnu skupinu, utvrđeno je da se prisutnost alela A polimorfizma IL-10 rs1800896, koji je povezan s niskom produkcijom IL-10, može smatrati neovisnim čimbenikom rizika za AB (Lio i sur., 2003). U istraživanju tri polimorfizma IL-10 utvrđena je snažna povezanost između polimorfizama rs1800896, rs1800871, rs1800872 i AB, naime smanjena ekspresija IL-10 povezana je s alelima C rs1800871 i alelima C rs1800872 (Arosio i sur., 2004). Kod drugih bolesti, npr. kod Crohnove bolesti, primijećeno je da je koncentracija IL-10 povišena u nosioca A alela rs1800896 (Wang i sur., 2011).

Za razliku od malog broja podataka o utjecaju polimorfizma IL-10 rs1800896 na koncentraciju IL-10 u serumu kod bolesnika s AB i MCI, podaci *in vitro* studija otkrili su da je G alel IL-10 bio povezan s prekomjernom ekspresijom IL-10 *in vitro* (Turner i sur., 1997), dok je stvaranje IL-10 bilo smanjeno u stimuliranim mononuklearnim stanicama periferne krvi, nosioca AA i AG, izoliranim od zdravih kontrola. S druge strane, pronađeno je da je kod beta staničnih linija inficiranih Epstein-Barr virusom A alel povezan s dvostruko većom transkripcijskom aktivnošću IL-10 promotora u odnosu na G alel, ali je također utvrđena velika raznolikost u produkciji IL-10 u perifernim mononuklearnim stanicama *in vitro* i to neovisno o genotipu IL-10 rs1800896 (Rees i sur., 2002). Pokazano je da osobe koje su homozigoti za G alel IL-10 rs1800896 imaju višu koncentraciju IL-10 u cirkulaciji i veću ekspresiju IL-10 mRNA te veću produkciju IL-10 nakon stimulacije *in vitro* ili u zdravih španjolskih ispitanika (Suárez i sur., 2003) ili kod kardiovaskularnih ispitanika (Galley i sur., 2003). Oslobođanje IL-10 stimulirano lipopolisaharidima u humanim krvnim staničnim kulturama je značajno variralo pod utjecajem IL-10 promotorskih haplotipova (Eskdale i sur., 1998).

5.7. Ograničenje studije

Određena ograničenja studije treba istaknuti. Studija je uključila relativno malen broj ispitanika (N = 174). Taj je broj bio dovoljan za istraživanje koncentracije citokina u serumu ispitanika s AB i MCI. Potreban broj ispitanika je izračunat unaprijed pomoću G*Power 3 analize (Faul i sur., 2009). Za biokemijske analize, tj. za usporedbu 2 skupine kod određivanja koncentracije citokina u serumu, studija je uz predviđenu umjerenu veličinu učinka = 0,50, i statističku snagu od 0,800, trebala imati minimalno 128 uzoraka (64 po skupini); dok je za ANOVA-u s 3 skupine ispitanika uz umjerenu veličinu učinka = 0,25, i statističku snagu od 0,800, trebala uključiti 159 ispitanika. Budući da je studija uključila 174 ispitanika, imala je dovoljan/dostatan broj uključenih ispitanika kako bi se utvrdile značajne razlike između skupina. Međutim, taj broj nije bio dostatan za istraživanje raspodjele genotipova obzirom na IL-1 α rs1800587, TNF- α rs1800629 i IL-10 rs1800896 polimorfizme. Kognitivne sposobnosti bile su evaluirane samo pomoću skala MMSE i Testa crtanja sata.

5.8. Prednosti studije

Prednosti studije također treba navesti – svi su ispitanici uključeni u studiju prošli psihijatrijsku evaluaciju, dijagnostičke postupke i kognitivna testiranja u Klinici za psihijatriju Vrapče. Psihijatri s iskustvom u psihijatriji starije životne dobi iz Zavoda za biologijsku psihijatriju i psihogerijatriju su sudjelovali u evaluaciji, odabiru i uzorkovanju ispitanika. Uzorkovanje je provedeno za vrijeme redovitih laboratorijskih rutinskih analiza. Svi su ispitanici bili osobe oba spola bijele rase hrvatskog porijekla, kako bi se izbjegle moguće etničke razlike u raspodjeli IL-1 α rs1800587, TNF- α rs1800629 i IL-10 rs1800896 genotipova. Na taj je način istražen i moguć utjecaj spola na istraživane varijable. Također, svi su ispitanici i podijeljeni prema spolu kako bi se dodatno utvrdile moguće spolom izazvane razlike u koncentraciji IL-1 α , TNF- α i IL-10 citokina ili u raspodjeli IL-1 α rs1800587, TNF- α rs1800629 i IL-10 rs1800896 genotipova. Kako bi se premostio nedostatak dovoljnog broja ispitanika za genotipiziranje (N = 174), rezultati su provjereni na povećanim skupinama (N = 645) ispitanika s AB i MCI uključenih u naše prijašnje studije/protokole. G*Power 3 analiza (Faul i sur., 2009) je pokazala da za genotipiziranje, tj. usporedbu pojavljivanja genotipova/alela između 2 skupine ispitanika, uz očekivani mali učinak = 0,15, i statističku snagu od 0,800, za χ^2 -test je bilo potrebno uključiti N = 429 ispitanika. Radi toga je za taj dio studije napravljena potvrda na 645 ispitanika, što je bio dovoljan broj uključenih ispitanika kako bi se mogle pronaći značajne razlike u genotipskim analizama ako one postoje između skupina. Rezultati o nedostatku povezanosti IL-1 α rs1800587, TNF- α rs1800629 i IL-10 rs1800896 polimorfizama s AB bili su potvrđeni i na tom

većem broju ispitanika (Culjak i sur., 2020). Također, svi su rezultati korigirani pomoću Benjamini-Hochberg korekcije za multiplo testiranje.

5.9. Zaključak

Ova je studija utvrdila da se koncentracije citokina IL-1 α , TNF- α i IL-10 značajno razlikuju između ispitanika s AB i MCI. Ispitanici s AB imali su značajno povišenu koncentraciju TNF- α i značajno sniženu koncentraciju IL-10 i IL-1 α u serumu prema vrijednostima kod ispitanika s MCI. Nije uočena značajna povezanost između koncentracije IL-1 α , TNF- α i IL-10 u serumu s kognitivnim simptomima. Nije utvrđena značajna povezanost između IL-1 α rs1800587, TNF- α rs1800629 i IL-10 rs1800896 polimorfizama s AB ili s kognitivnim simptomima u AB i MCI ili s koncentracijom citokina IL-1 α , TNF- α i IL-10. Naša je studija utvrdila da nema značajne razlike u IL-1 α rs1800587, TNF- α rs1800629 i IL-10 rs1800896 genotipovima između ispitanika s AB i MCI. Citokini IL-1 α , TNF- α i IL-10, korigirani za dob, spol i brojeve bodova na MMSE i Testu crtanja sata bili su značajno promijenjeni između skupina ispitanika bijele rase s AB i MCI. Rezultati studije upućuju na važnu ulogu imunog sustava u AB, pokazujući snižene koncentracije IL-1 α i IL-10 i povišene vrijednosti TNF- α u serumu ispitanika s AB prema ispitanicima s MCI. Ti su rezultati potvrda poremećene regulacije imunog sustava u AB i neurodegenerativnim procesima. Ovo istraživanje nije uspjelo otkriti točne mehanizme promjena tih citokina u podlozi AB i MCI. Promijenjene koncentracije IL-1 α , TNF- α i IL-10 nisu bile pod utjecajem dobi, spola ili odgovarajućih genotipova obzirom na IL-1 α rs1800587, TNF- α rs1800629 i IL-10 rs1800896 polimorfizme kod ispitanika s AB i MCI.

Iako bi kod istraživanja genetskog utjecaja citokina na razvoj AB cjelogenomske studije povezanosti (GWAS) trebale pojasniti mogući utjecaj različitih citokina na razvoj AB, GWAS studije u AB nisu doprinjele razjašnjenju te povezanosti (Lambert i sur., 2013; Shen i Jia, 2016). Pretpostavlja se da su razlozi različiti, u tim studijama se rade multiple korekcije radi multiplog testiranja pa niti jedan od istraživanih citokinskih SNP-ova nije značajan na genomskoj razini, ili radi toga što su istraživani učinci pojedinih SNP-ova jako mali, ili radi razlika među skupinama u etnicitetu, populacijama, rasi, dobi, spolu, te radi razlika u dijagnostičkim kategorijama koje se uspoređuju (AB vs. MCI ili AB vs. kontrole), radi razlika u prehranbenim navikama, dijeti, ili infekcijama i upalama u podlozi čestim u starijih osoba koje mogu utjecati na koncentraciju citokina (Lambert i sur., 2013; Shen i Jia, 2016). Dakle,

potrebne su daljnje studije s većim skupinama koje će istraživati paralelno citokine i njihove odgovarajuće polimorfizme kako bi se razjasnila njihova uloga u razvoju AB (Su i sur., 2016).

6. ZAKLJUČCI

1. Utvrđene su značajne razlike u koncentraciji citokina IL-1 α , TNF- α i IL-10 između ispitanika s AB i MCI – koncentracija citokina IL-1 α i IL-10 u serumu bila je značajno snižena kod ispitanika s AB u odnosu na ispitanike s MCI; dok je koncentracija citokina TNF- α u serumu bila je značajno povišena u ispitanika s AB u odnosu na ispitanike s MCI. Ti su podatci uputili na djelimično potvrđenu hipotezu o neuropali kao riziku za razvoj AB.
2. Nije bilo značajne povezanosti između koncentracije IL-1 α , TNF- α i IL-10 u serumu ispitanika s kognitivnim simptomima, upućujući da izabrani citokini nisu povezani s kognitivnim propadanjem u AB.
3. Koncentracija IL-1 α nije se značajno razlikovala unutar ispitanika s AB ili unutar ispitanika s MCI podijeljenih na IL-1 α rs1800587 genotipove; koncentracije TNF- α nije se značajno razlikovala unutar ispitanika s AB ili unutar ispitanika s MCI podijeljenih na TNF- α rs1800629 genotipove a koncentracije IL-10 nije se značajno razlikovala unutar ispitanika s AB ili unutar ispitanika s MCI podijeljenih na IL-10 rs1800896 genotipove. Ti su podatci pokazali da koncentracije IL-1 α , TNF- α i IL-10 u serumu nisu značajno povezane s polimorfizmima IL-1 α rs1800587, TNF- α rs1800629 i IL-10 rs1800896.
4. Nije utvrđena značajna razlika u raspodjeli IL-1 α rs1800587, TNF- α rs1800629 i IL-10 rs1800896 genotipova ili alela između ispitanika s AB i MCI; ti su podatci pokazali da nisu utvrđeni rizični genotipovi obzirom na polimorfizme IL-1 α rs1800587, TNF- α rs1800629 i IL-10 rs1800896 povezani s razvojem AB.
5. Nije utvrđena značajna razlika između ispitanika s AB i ispitanika s MCI po spolu, iako su u obje skupine prevladavale osobe ženskog spola; utvrđene su značajne razlike razlike u dobi ispitanika s AB i ispitanika s MCI, jer su ispitanici s AB bili značajno stariji od ispitanika s MCI
6. Očekivano, ispitanici s MCI postigli su značajno veći broj bodova na MMSE testu nego ispitanici s AB; i ispitanici s MCI postigli su značajno veći broj bodova na Testu crtanja sata nego ispitanici s AB.
7. Koncentracije citokina IL-1 α , TNF- α i IL-10 u serumu nisu se značajno razlikovale između muških i ženskih ispitanika s AB ili između muških i ženskih ispitanika s MCI
8. Nisu utvrđene značajne razlike u rezultatima MMSE testa i Testu crtanja sata kod ispitanika s AB ili kod ispitanika s MCI podijeljenih u nosioce TC, CC i TT obzirom na polimorfizam IL-1 α rs1800587; nisu utvrđene značajne razlike u rezultatima MMSE testa i Testu crtanja sata kod ispitanika s AB ili kod ispitanika s MCI

podijeljenih u nosioce GG i A nosioce obzirom na TNF- α rs1800629; nisu utvrđene značajne razlike u rezultatima MMSE testa i Testu crtanja sata kod ispitanika s AB ili kod ispitanika s MCI podijeljenih u nosioce AA, GG i AG obzirom na IL-10 rs1800896. Ti su rezultati potvrdili da nema značajne povezanosti između 3 različita polimorfizma za IL-10 rs1800896, IL-1 α rs1800587 i TNF- α rs1800629 i kognitivnih simptoma u ispitanika s AB i MCI.

9. Nije utvrđena značajna povezanost između dobi, Testa crtanja sata i MMSE testa s koncentracijama citokina IL-1 α , TNF- α i IL-10 kod ispitanika s AB ispitanika i ispitanika s MCI - no kod ispitanika s MCI, pokazana je značajna korelacija samo između broja bodova na skali MMSE i dobi jer su stariji ispitanici rješavali MMSE test slabije od mlađih ispitanika.
10. Ovo je istraživanje potvrdilo hipotezu da su promjene u koncentraciji citokina IL-1 α , TNF- α i IL-10, u serumu povezane s razvojem AB, ali da genetičke varijante IL-1 α rs1800587, TNF- α rs1800629 i IL-10 rs1800896 nisu povezane s AB, te da promjene u koncentraciji citokina IL-1 α , TNF- α i IL-10 u serumu i različite genetičke varijante varijante IL-1 α rs1800587, TNF- α rs1800629 i IL-10 rs1800896 nisu povezane s razvojem kognitivnih simptoma u AB.

7. POPIS CITIRANE LITERATURE

- Abdulkhaleq LA, Assi MA, Abdullah R, Zamri-Saad M, Taufiq-Yap YH, Hezmee MNM. The crucial roles of inflammatory mediators in inflammation: A review. *Vet World*. 2018;11(5):627-635.
- Aisen PS, Schafer KA, Grundman M, et al. Effects of rofecoxib or naproxen vs placebo on Alzheimer disease progression: a randomized controlled trial. *JAMA*. 2003;289(21):2819-2826.
- Akdis M, Burgler S, Cramer R, et al. Interleukins, from 1 to 37, and interferon- γ : receptors, functions, and roles in diseases. *J Allergy Clin Immunol*. 2011;127(3):701-21.e270.
- Akiyama H, Barger S, Barnum S, et al. Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2000;21(3):383-421.
- Akoglu H. User's guide to correlation coefficients. *Turk J Emerg Med*. 2018;18(3):91-93.
- Alvarez A, Cacabelos R, Sanpedro C, García-Fantini M, Aleixandre M. Serum TNF-alpha levels are increased and correlate negatively with free IGF-I in Alzheimer disease. *Neurobiol Aging*. 2007;28(4):533-536.
- Alvarez XA, Franco A, Fernández-Novoa L, Cacabelos R. Blood levels of histamine, IL-1 beta, and TNF-alpha in patients with mild to moderate Alzheimer disease. *Mol Chem Neuropathol*. 1996;29(2-3):237-252.
- Andrea Nani, Andrea ECavanna, *Neuroimaging Studies of the Dwindling Self: Neurodegenerative Dementias, Neuroimaging of Consciousness*. Springer, Berlin, Heidelberg, 2013;pp 247-261.
- Angelopoulos P, Agouridaki H, Vaiopoulos H, et al. Cytokines in Alzheimer's disease and vascular dementia. *Int J Neurosci*. 2008;118(12):1659-1672.
- Arango Duque G, Descoteaux A. Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious diseases. *Front Immunol*. 2014;5:491.
- Ardebili SM, Yeghaneh T, Gharesouran J, et al. Genetic association of TNF- α -308 G/A and -863 C/A polymorphisms with late onset Alzheimer's disease in Azeri Turk population of Iran. *J Res Med Sci*. 2011;16(8):1006-1013.
- Arosio B, Mastronardi L, Vergani C, Annoni G. Interleukin-10 promoter polymorphism in mild cognitive impairment and in its clinical evolution. *Int J Alzheimers Dis*. 2010;2010:854527.
- Arosio B, Trabattoni D, Galimberti L, et al. Interleukin-10 and interleukin-6 gene polymorphisms as risk factors for Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2004;25(8):1009-1015.

- Awada AA. Early and late-onset Alzheimer's disease: What are the differences? *J Neurosci Rural Pract.* 2015;6(3):455-456.
- Babić Leko M, Nikolac Perković M, Klepac N, et al. IL-1 β , IL-6, IL-10, and TNF α Single Nucleotide Polymorphisms in Human Influence the Susceptibility to Alzheimer's Disease Pathology. *J Alzheimers Dis.* 2020;75(3):1029-1047.
- Bagnoli S, Cellini E, Tedde A, et al. Association of IL-10 promoter polymorphism in Italian Alzheimer's disease. *Neurosci Lett.* 2007;418(3):262-265.
- Bagyinszky E, Youn YC, An SS, Kim SY. The genetics of Alzheimer's disease. *Clin Interv Aging.* 2014;9:535-551.
- Baranowska-Bik A, Bik W, Wolinska-Witort E, et al. Plasma beta amyloid and cytokine profile in women with Alzheimer's disease. *Neuro Endocrinol Lett.* 2008;29(1):75-79.
- Barber RC. The genetics of Alzheimer's disease. *Scientifica (Cairo).* 2012;2012:246210.
- Barnes LL, Wilson RS, Bienias JL, Schneider JA, Evans DA, Bennett DA. Sex differences in the clinical manifestations of Alzheimer disease pathology. *Arch Gen Psychiatry.* 2005;62(6):685-691.
- Baune BT, Ponath G, Rothermundt M, Riess O, Funke H, Berger K. Association between genetic variants of IL-1beta, IL-6 and TNF-alpha cytokines and cognitive performance in the elderly general population of the MEMO-study. *Psychoneuroendocrinology.* 2008;33(1):68-76.
- Benke KS, Carlson MC, Doan BQ, et al. The association of genetic variants in interleukin-1 genes with cognition: findings from the cardiovascular health study. *Exp Gerontol.* 2011;46(12):1010-1019.
- Bennet AM, van Maarle MC, Hallqvist J, et al. Association of TNF-alpha serum levels and TNFA promoter polymorphisms with risk of myocardial infarction. *Atherosclerosis.* 2006;187(2):408-414.
- Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *J R Stat Soc Ser B Methodol.* 1995;57(1):289-300.
- Bermejo P, Martín-Aragón S, Benedí J, et al. Differences of peripheral inflammatory markers between mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Immunol Lett.* 2008;117(2):198-202.
- Bertram L, McQueen MB, Mullin K, Blacker D, Tanzi RE. Systematic meta-analyses of Alzheimer disease genetic association studies: the AlzGene database. *Nat Genet.* 2007;39(1):17-23.

- Bertram L, Tanzi RE. The genetic epidemiology of neurodegenerative disease. *J Clin Invest.* 2005;115(6):1449-1457.
- Beste C, Baune BT, Falkenstein M, Konrad C. Variations in the TNF- α gene (TNF- α -308G \rightarrow A) affect attention and action selection mechanisms in a dissociated fashion. *J Neurophysiol.* 2010 Nov;104(5):2523-2531.
- Beste C, Güntürkün O, Baune BT, Domschke K, Falkenstein M, Konrad C. Double dissociated effects of the functional TNF- α -308G/A polymorphism on processes of cognitive control. *Neuropsychologia.* 2011;49(2):196-202.
- Biella G, Franceschi M, De Rino F, et al. Multiplex assessment of a panel of 16 serum molecules for the differential diagnosis of Alzheimer's disease. *Am J Neurodegener Dis.* 2013;2(1):40-45.
- Biswas RK, Kabir E, King R. Effect of sex and age on traumatic brain injury: a geographical comparative study. *Arch Public Health.* 2017;75:43.
- Bixler EO, Vgontzas AN, Lin HM, et al. Prevalence of sleep-disordered breathing in women: effects of gender. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001;163(3 Pt 1):608-613.
- Björkqvist M, Ohlsson M, Minthon L, Hansson O. Evaluation of a previously suggested plasma biomarker panel to identify Alzheimer's disease. *PLoS One.* 2012;7(1):e29868.
- Blenow K. Cerebrospinal fluid protein biomarkers for Alzheimer's disease. *NeuroRx.* 2004;1(2):213-225.
- Bonotis K, Krikki E, Holeva V, Aggouridaki C, Costa V, Baloyannis S. Systemic immune aberrations in Alzheimer's disease patients. *J Neuroimmunol.* 2008;193(1-2):183-187.
- Borsini A, Zunszain PA, Thuret S, Pariante CM. The role of inflammatory cytokines as key modulators of neurogenesis. *Trends Neurosci.* 2015;38(3):145-157.
- Bortolato B, Miskowiak KW, Köhler CA, Vieta E, Carvalho AF. Cognitive dysfunction in bipolar disorder and schizophrenia: a systematic review of meta-analyses. *Neuropsychiatr Dis Treat.* 2015;11:3111-3125.
- Boyle PA, Wilson RS, Aggarwal NT, Tang Y, Bennett DA. Mild cognitive impairment: risk of Alzheimer disease and rate of cognitive decline. *Neurology.* 2006;67(3):441-445.
- Brayne C, Miller B. Dementia and aging populations-A global priority for contextualized research and health policy. *PLoS Med.* 2017;14(3):e1002275.
- Breitner JC, Gau BA, Welsh KA, et al. Inverse association of anti-inflammatory treatments and Alzheimer's disease: initial results of a co-twin control study. *Neurology.* 1994;44(2):227-232.

- Breitner JC, Zandi PP. Do nonsteroidal antiinflammatory drugs reduce the risk of Alzheimer's disease? *N Engl J Med.* 2001;345(21):1567-1568.
- Brodsky H, Pond D, Kemp NM, et al. The GPCOG: a new screening test for dementia designed for general practice. *J Am Geriatr Soc.* 2002;50(3):530-534.
- Brosseron F, Krauthausen M, Kummer M, Heneka MT. Body fluid cytokine levels in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease: a comparative overview. *Mol Neurobiol.* 2014;50(2):534-544.
- Brunsgaard H, Andersen-Ranberg K, Jeune B, Pedersen AN, Skinhøj P, Pedersen BK. A high plasma concentration of TNF-alpha is associated with dementia in centenarians. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 1999;54(7):M357–M364.
- Brüunsgaard H, Pedersen BK. Age-related inflammatory cytokines and disease. *Immunol Allergy Clin North Am.* 2003;23(1):15-39.
- Bryson KJ, Lynch MA. Linking T cells to Alzheimer's disease: from neurodegeneration to neurorepair. *Curr Opin Pharmacol.* 2016;26:67-73.
- Buckwalter JG, Sobel E, Dunn ME, Diz MM, Henderson VW. Gender differences on a brief measure of cognitive functioning in Alzheimer's disease. *Arch Neurol.* 1993;50(7):757-760.
- Buée L, Bussière T, Buée-Scherrer V, Delacourte A, Hof PR. Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Res Brain Res Rev.* 2000;33(1):95-130.
- Bullain SS, Corrada MM. Dementia in the oldest old. *Continuum (Minneapolis Minn).* 2013;19(2 Dementia):457-469.
- Bussmann J, Raz E. Chemokine-guided cell migration and motility in zebrafish development. *EMBO J.* 2015;34(10):1309-1318.
- Butchart J, Birch B, Bassily R, Wolfe L, Holmes C. Male sex hormones and systemic inflammation in Alzheimer disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord.* 2013;27(2):153-156.
- Buxbaum JD, Oishi M, Chen HI, et al. Cholinergic agonists and interleukin 1 regulate processing and secretion of the Alzheimer b/A4 amyloid protein precursor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:10075-10078.
- Cacabelos R, Alvarez XA, Franco-Maside A, Fernández-Novoa L, Caamaño J. Serum tumor necrosis factor (TNF) in Alzheimer's disease and multi-infarct dementia. *Methods Find Exp Clin Pharmacol.* 1994;16(1):29-35.
- Cacquevel M, Lebourrier N, Cheenne S, Vivien D. Cytokines in neuroinflammation and Alzheimer's disease. *Curr Drug Targets* 2004;5(6):529-534.

- Cadar D, Lassale C, Davies H, Llewellyn DJ, Batty GD, Steptoe A. Individual and Area-Based Socioeconomic Factors Associated With Dementia Incidence in England: Evidence From a 12-Year Follow-up in the English Longitudinal Study of Ageing. *JAMA Psychiatry*. 2018;75(7):723-732.
- Cagnin A, Brooks DJ, Kennedy AM, et al. In-vivo measurement of activated microglia in dementia. *Lancet*. 2001;358(9280):461-467.
- Camargo CH, Justus FF, Retzlaff G. The effectiveness of reality orientation in the treatment of Alzheimer's disease. *Am J Alzheimers Dis Other Demen*. 2015;30(5):527-532.
- Campbell NL, Unverzagt F, LaMantia MA, Khan BA, Boustani MA. Risk factors for the progression of mild cognitive impairment to dementia. *Clin Geriatr Med*. 2013;29(4):873-893.
- Candore G, Balistreri CR, Grimaldi MP, et al. Polymorphisms of pro-inflammatory genes and Alzheimer's disease risk: a pharmacogenomic approach. *Mech Ageing Dev*. 2007;128(1):67-75.
- Carrasco M. Visual attention: The past 25 years. *Vis Res*. 2011;51(13):1484-1525.
- Cerri AP, Arosio B, Viazzoli C, Confalonieri R, Vergani C, Annoni G. The -308 (G/A) single nucleotide polymorphism in the TNF-alpha gene and the risk of major depression in the elderly. *Int J Geriatr Psychiatry*. 2010;25(3):219-223.
- Cesari M, Penninx BW, Pahor M, et al. Inflammatory markers and physical performance in older persons: the InCHIANTI study. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2004;59(3):242-248.
- Chacon-Cortes D, Griffiths LR: Methods from extracting genomic DNA from whole blood samples: current perspectives. *J. biorepos. sci. appl. med* 2014;2:1-9.
- Chakrabarty P, Li A, Ceballos-Diaz C, et al. IL-10 alters immunoproteostasis in APP mice, increasing plaque burden and worsening cognitive behavior. *Neuron*. 2015;85(3):519-533.
- Chaplin DD. Overview of the immune response. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;125(2 Suppl 2):S3-S23.
- Chen L, Deng H, Cui H, et al. Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget*. 2017;9(6):7204-7218.
- Cheng X, Yang L, He P, Li R, Shen Y. Differential activation of tumor necrosis factor receptors distinguishes between brains from Alzheimer's disease and non-demented patients. *J Alzheimers Dis*. 2010;19(2):621-630.

- Chertkow H, Feldman HH, Jacova C, Massoud F. Definitions of dementia and predementia states in Alzheimer's disease and vascular cognitive impairment: consensus from the Canadian conference on diagnosis of dementia. *Alzheimers Res Ther.* 2013;5(Suppl 1):S2.
- Cioffi M, Esposito K, Vietri MT, et al. Cytokine pattern in postmenopause. *Maturitas.* 2002;41:187-192.
- Clark A, Islam S, King Y, et al. A longitudinal study of resolution of allergy to well-cooked and uncooked egg. *Clin Exp Allergy.* 2011;41(5):706-712.
- Cohn-Hokke PE, Elting MW, Pijnenburg YAL, van Swieten JC. Genetics of dementia: update and guidelines for the clinician. *Am J Med Genet Part B Neuropsychiatr Genet* 2012;159B(6):628-643.
- Combarros O, van Duijn CM, Hammond N, et al. Replication by the Epistasis Project of the interaction between the genes for IL-6 and IL-10 in the risk of Alzheimer's disease. *J Neuroinflammation.* 2009;6(1):22.
- Combarros O, Llorca J, Sánchez-Guerra M, Infante J, Berciano J. Age-dependent association between interleukin-1A (-889) genetic polymorphism and sporadic Alzheimer's disease. A meta-analysis. *J Neurol.* 2003;250(8):987-989.
- Combarros O, Sánchez-Guerra M, Infante J, Llorca J, Berciano J. Gene dose-dependent association of interleukin-1A [-889] allele 2 polymorphism with Alzheimer's disease. *J Neurol.* 2002;249(9):1242-1245.
- Combarros O, Sánchez-Juan P, Riancho JA, et al. Aromatase and interleukin-10 genetic variants interactively modulate Alzheimer's disease risk. *J Neural Transm.* 2008;115(6):863-867.
- Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, et al. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science.* 1993;261(5123):921-923.
- Correas I, Padilla R, Avila J. The tubulin-binding sequence of brain microtubule-associated proteins, tau and MAP-2, is also involved in actin binding. *Biochem J.* 1990;269(1):61-64.
- Craft S. The role of metabolic disorders in Alzheimer disease and vascular dementia: two roads converged. *Arch Neurol.* 2009;66(3):300-305.
- Cui YH, Le Y, Zhang X, et al. Up-regulation of FPR2, a chemotactic receptor for amyloid beta 1-42 (A beta 42), in murine microglial cells by TNF alpha. *Neurobiol Dis.* 2002;10(3):366-377.

- Culjak M, Nikolac Perkovic M, Uzun S, et al. The association between TNF-alpha, IL-1 alpha and IL-10 with Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res.* 2020, prihvaćen za tisak.
- Culpan D, Prince JA, Matthews S, et al. Neither sequence variation in the IL-10 gene promoter nor presence of IL-10 protein in the cerebral cortex is associated with Alzheimer's disease. *Neurosci Lett.* 2006;408(2):141-145.
- Dagdeviren S, Jung DY, Friedline RH, et al. IL-10 prevents aging-associated inflammation and insulin resistance in skeletal muscle. *FASEB J.* 2017;31(2):701-710.
- Dallmeyer S, Wicker P, Breuer C. How an aging society affects the economic costs of inactivity in Germany: empirical evidence and projections. *Eur Rev Aging Phys Act.* 2017;14:18.
- D'Anna L, Abu-Rumeileh S, Fabris M, et al. Serum Interleukin-10 Levels Correlate with Cerebrospinal Fluid Amyloid Beta Deposition in Alzheimer Disease Patients. *Neurodegener Dis.* 2017;17(4-5):227-234.
- Dato S, Krabbe KS, Thinggaard M, et al. Commonly studied polymorphisms in inflammatory cytokine genes show only minor effects on mortality and related risk factors in nonagenarians. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2010;65(3):225-235.
- de Vaal Malefyt R, Abrams J, Bennett B, Frigdor CG, de Vries JE. Interleukin 10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med* 1991;174:1209-1220.
- Decourt B, Lahiri DK, Sabbagh MN. Targeting Tumor Necrosis Factor Alpha for Alzheimer's Disease. *Curr Alzheimer Res.* 2017;14(4):412-425.
- Demirci S, Aynalı A, Demirci K, Demirci S, Aridoğan BC. The Serum Levels of Resistin and Its Relationship with Other Proinflammatory Cytokines in Patients with Alzheimer's Disease. *Clin Psychopharmacol Neurosci.* 2017;15(1):59-63.
- Depboylu C, Du Y, Müller U, et al. Lack of association of interleukin-10 promoter region polymorphisms with Alzheimer's disease. *Neurosci Lett.* 2003;342(1-2):132-134.
- Di Bona D, Candore G, Franceschi C, et al. Systematic review by meta-analyses on the possible role of TNF-alpha polymorphisms in association with Alzheimer's disease. *Brain Res Rev.* 2009;61(2):60-68.
- Di Paolo NC, Shayakhmetov DM. Interleukin 1 α and the inflammatory process. *Nat Immunol.* 2016;17(8):906-913.
- Dickson DW. The pathogenesis of senile plaques. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1997;56(4):321-339.
- Dinarello CA. Historical insights into cytokines. *Eur J Immunol.* 2007;37 Suppl 1(Suppl 1):S34-45.

- Dinarello CA. Overview of the IL-1 family in innate inflammation and acquired immunity. *Immunol Rev.* 2018;281(1):8-27.
- Diniz BS, Teixeira AL, Ojopi EB, et al. Higher serum sTNFR1 level predicts conversion from mild cognitive impairment to Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 2010;22(4):1305-1311.
- Doecke JD, Laws SM, Faux NG, et al. Blood-based protein biomarkers for diagnosis of Alzheimer disease. *Arch Neurol.* 2012;69(10):1318-1325.
- Dolan PJ, Johnson GV. The role of tau kinases in Alzheimer's disease. *Curr Opin Drug Discov Devel.* 2010;13(5):595-603.
- Dominici R, Cattaneo M, Malferrari G, et al. Cloning and functional analysis of the allelic polymorphism in the transcription regulatory region of interleukin-1 alpha. *Immunogenetics.* 2002;54(2):82-86.
- Dong X, Zhang L, Meng Q, Gao Q. Association Between Interleukin-1A, Interleukin-1B, and Bridging integrator 1 Polymorphisms and Alzheimer's Disease: a standard and Cumulative Meta-analysis. *Mol Neurobiol.* 2017;54(1):736-747.
- Doty KR, Guillot-Sestier MV, Town T. The role of the immune system in neurodegenerative disorders: Adaptive or maladaptive? *Brain Res.* 2015;1617:155-173.
- Dursun E, Gezen-Ak D, Hanağası H, et al. The interleukin 1 alpha, interleukin 1 beta, interleukin 6 and alpha-2-macroglobulin serum levels in patients with early or late onset Alzheimer's disease, mild cognitive impairment or Parkinson's disease. *J Neuroimmunol.* 2015;283:50-57.
- Eckert A, Schmitt K, Götz J. Mitochondrial dysfunction-the beginning of the end in Alzheimer's disease? Separate and synergistic modes of tau and amyloid- β toxicity. *Alzheimers Res Ther.* 2011;3(2):15.
- Edland SD, Rocca WA, Petersen RC, Cha RH, Kokmen E. Dementia and Alzheimer disease incidence rates do not vary by sex in Rochester. Minn. *Arch Neurol.* 2002;59(10):1589-1593.
- Edwards M, Balldin VH, Hall J, O'Bryant S. Combining select neuropsychological assessment with blood-based biomarkers to detect mild Alzheimer's disease: a molecular neuropsychology approach. *J Alzheimers Dis.* 2014;42(2):635-640.
- El-Tahan RR, Ghoneim AM, El-Mashad N. TNF- α gene polymorphisms and expression. *Springerplus.* 2016; 5(1): 1508.

- Eskdale J, Gallagher G, Verweij CL, Keijsers V, Westendorp RG, Huizinga TW. Interleukin 10 secretion in relation to human IL-10 locus haplotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(16):9465-9470.
- Espinoza M, de Silva R, Dickson DW, Davies P. Differential incorporation of tau isoforms in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*. 2008;14(1):1-16.
- Fabrègue F, Butkowski E, Voigt A, et al. Association of Inflammation and Possible Mild Cognitive Decline Measured by the Stroop Cognitive Function Test. *J Alzheimers Dis Parkinsonism*. 2016;6(3):1-5.
- Faul F, Erdfelder E, Buchner A, Lang AG. Statistical power analyses using G*Power 3.1: tests for correlation and regression analyses. *Behav Res Methods*. 2009;41(4):1149-1160.
- Fauth EB, Femia EE, Zarit SH. Resistiveness to care during assistance with activities of daily living in non-institutionalized persons with dementia: associations with informal caregivers' stress and well-being. *Aging Ment Health*. 2016;20(9):888-898.
- Fernández-Ballesteros R, Robine JM, Walker A, Kalache A. Active aging: a global goal. *Curr Gerontol Geriatr Res*. 2013;2013:298012.
- Ferretti MT, Iulita MF, Cavedo E, et al. Sex differences in Alzheimer disease-the gateway to precision medicine. *Nat Rev Neurol*. 2018;14(8):457-469.
- Feuerstein GZ, Liu T, Barone FC. Cytokines, inflammation, and brain injury: role of tumor necrosis factor-alpha. *Cerebrovasc Brain Metab Rev*. 1994;6(4):341-360.
- Fillenbaum GG, Hughes DC, Heyman A, George LK, Blazer DG. Relationship of health and demographic characteristics to Mini-Mental State examination score among community residents. *Psychol Med*. 1988;18(3):719-726.
- Fillit H, Ding WH, Buee L, et al. Elevated circulating tumor necrosis factor levels in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*. 1991;129(2):318-320.
- Fleminger S, Oliver DL, Lovestone S, Rabe-Hesketh S, Giora A. Head injury as a risk factor for Alzheimer's disease: the evidence 10 years on; a partial replication. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2003;74(7):857-862.
- Flex A, Giovannini S, Biscetti F, et al. Effect of proinflammatory gene polymorphisms on the risk of Alzheimer's disease. *Neurodegener Dis*. 2014;13(4):230-236.
- Flicker C, Ferris SH, Reisberg B. Mild cognitive impairment in the elderly: predictors of dementia. *Neurology*. 1991;41(7):1006-1009.
- Forlenza OV, Diniz BS, Talib LL, et al. Teixeira AL. Increased serum IL-1beta level in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 2009;28(6):507-512.

- Fraga VG, Guimarães HC, Teixeira AL, et al. Polymorphisms in cytokine genes influence cognitive and functional performance in a population aged 75 years and above. *Int J Geriatr Psychiatry*. 2017;32(12):1401-1410.
- Franceschi C, Bonafè M, Valensin S, et al. Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence. *Ann NY Acad Sci*. 2000; 908:244-254.
- Fratiglioni L, Viitanen M, von Strauss E, et al. Very old women at highest risk of dementia and Alzheimer's disease: incidence data from the Kungsholmen Project, Stockholm. *Neurology* 1997; 48(1):132-138.
- Frölich L, Blum-Degen D, Bernstein HG, et al. Brain insulin and insulin receptors in aging and sporadic Alzheimer's disease. *J Neural Transm (Vienna)*. 1998;105(4-5):423-438.
- Gajewski PD, Falkenstein M. Neurocognition of aging in working environments. *J. Labour Market Res*. 2011; 44(4): 307-320.
- Gajewski PD, Hengstler JG, Golka K, Falkenstein M, Beste C. The functional tumor necrosis factor- α (308A/G) polymorphism modulates attentional selection in elderly individuals. *Neurobiol Aging*. 2013;34(11):2694.e1-2694.e12.
- Galasko D, Golde TE. Biomarkers for Alzheimer's disease in plasma, serum and blood- conceptual and practical problems. *Alzheimers Res Ther*. 2013;5(2):10.
- Galasko D. An integrated approach to the management of Alzheimer's disease: assessing cognition, function and behaviour. *Eur J Neurol*. 1998;5suppl(4):S9-S17.
- Galley HF, Lowe PR, Carmichael RL, Webster NR. Genotype and interleukin-10 responses after cardiopulmonary bypass. *Br J Anaesth*. 2003;91(3):424-426.
- Ganguli M, Ratcliff G, Huff FJ, et al. Effects of age, gender, and education on cognitive tests in a rural elderly community sample: norms from the Monongahela Valley Independent Elders Survey. *Neuroepidemiology*. 1991;10(1):42-52.
- Garre-Olmo J. Epidemiologia de la enfermedad de Alzheimer y otras demencias [Epidemiology of Alzheimer's disease and other dementias]. *Rev Neurol*. 2018;66(11):377-386.
- Gauthier S, Reisberg B, Zaudig M, et al. Mild cognitive impairment. *Lancet*. 2006;367(9518):1262-1270.
- Geda YE. Mild cognitive impairment in older adults. *Curr Psychiatry Rep*. 2012;14(4):320-327.
- Georgiopoulos G, Chrysohoou C, Errigo A, et al. Arterial aging mediates the effect of TNF- α and ACE polymorphisms on mental health in elderly individuals: insights from IKARIA study. *QJM*. 2017;110(9):551-557.

- Gezen-Ak D, Dursun E, Hanağası H, et al. BDNF, TNF α , HSP90, CFH, and IL-10 serum levels in patients with early or late onset Alzheimer's disease or mild cognitive impairment. *J Alzheimers Dis.* 2013;37(1):185-195.
- Ghasemi A, Zahediasl S. Normality Tests for Statistical Analysis: A Guide for Non-Statisticians. *Int J Endocrinol Metab.* 2012;10(2):486-489.
- Giri M, Zhang M, Lü Y. Genes associated with Alzheimer's disease: an overview and current status. *Clin Interv Aging.* 2016;11:665-681.
- Glabe CG. Structural classification of toxic amyloid oligomers. *J Biol Chem.* 2008;283(44):29639-29643.
- Glass CK, Saijo K, Winner B, Marchetto MC, Gage FH. Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration. *Cell.* 2010;140(6):918-934.
- Goldgaber D, Harris HW, Hla T, et al. Interleukin 1 regulates synthesis of amyloid beta-protein precursor mRNA in human endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86(19):7606-7610.
- Golomb J, Kluger A, Ferris SH. Mild cognitive impairment: historical development and summary of research. *Dialogues Clin Neurosci.* 2004;6(4):351-367.
- Gomez-Nicola D, Boche D. Post-mortem analysis of neuroinflammatory changes in human Alzheimer's disease. *Alzheimers Res Ther.* 2015;7(1):42.
- Griffin WS, Mrak RE. Interleukin-1 in the genesis and progression of and risk for development of neuronal degeneration in Alzheimer's disease. *J Leukoc Biol.* 2002;72(2):233-238.
- Griffin WS, Sheng JG, Royston MC, et al. Glial-neuronal interactions in Alzheimer's disease: the potential role of a 'cytokine cycle' in disease progression. *Brain Pathol.* 1998;8(1):65-72.
- Griffin WS, Stanley LC, Ling C, et al. Brain interleukin 1 and S-100 immunoreactivity are elevated in Down syndrome and Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989;86(19):7611-7615.
- Grimaldi LM, Casadei VM, Ferri C, et al. Association of early-onset Alzheimer's disease with an interleukin-1alpha gene polymorphism. *Ann Neurol.* 2000;47(3):361-365.
- Guerreiro R, Bras J. The age factor in Alzheimer's disease. *Genome Med.* 2015;7:106.
- Guillot-Sestier MV, Doty KR, Gate D, et al. Il10 deficiency rebalances innate immunity to mitigate Alzheimer-like pathology. *Neuron.* 2015;85(3):534-548.
- Guillot-Sestier MV, Doty KR, Town T. Innate Immunity Fights Alzheimer's Disease. *Trends Neurosci.* 2015;38(11):674-681.

- Guo J, He YH, Chen F, et al. The A to G polymorphism at-1082 of the interleukin-10 gene is rare in the Han Chinese population. *Mol Med Rep.* 2012;6(4):894-896.
- Guo T, Noble W, Hanger DP. Roles of tau protein in health and disease. *Acta Neuropathol.* 2017; 133(5) 665-704.
- Hajeer AH, Hutchinson IV. Influence of TNFalpha gene polymorphisms on TNFalpha production and disease. *Hum Immunol.* 2001;62(11):1191-1199.
- Hamdan AA, Melconian AK, Ali A, Alhaidary AF. The level of IL-1 α , IL-10 and IL-17A in Alzheimer's disease patients: comparative study. *Baghdad Sci J.* 2014;11:1486-1491.
- Hamdy RC, Kinser A, Depelteau A, Kendall-Wilson T, Lewis JV, Whalen K. Patients with Dementia Are Easily Distracted. *Gerontol Geriatr Med.* 2017;3:2333721417735938.
- Hanger DP, Anderton BH, Noble W. Tau phosphorylation: the therapeutic challenge for neurodegenerative disease. *Trends Mol Med.* 2009;15(3):112-119.
- Hanger DP, Byers HL, Wray S, et al. Novel phosphorylation sites in tau from Alzheimer brain support a role for casein kinase 1 in disease pathogenesis. *J Biol Chem.* 2007;282(32):23645-23654.
- Harada CN, Natelson Love MC, Triebel KL. Normal cognitive aging. *Clin Geriatr Med.* 2013;29(4):737-752.
- Hardy J. Testing times for the “amyloid cascade hypothesis”. *Neurobiol Aging.* 2002;23(6):1073-1074.
- Harirforoosh S, Asghar W, Jamali F. Adverse effects of nonsteroidal antiinflammatory drugs: an update of gastrointestinal, cardiovascular and renal complications. *J. Pharm. Pharm Sci.* 2013;16(5):821-847.
- Harris DR, Bunz F. Protein phosphatases and the dynamics of the DNA damage response. *Cell Cycle.* 2010;9(5):861.
- Hayes A, Green EK, Pritchard A, et al. A polymorphic variation in the interleukin 1A gene increases brain microglial cell activity in Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2004;75(10):1475-1477.
- Hazen J, Vistnes M, Barca ML, et al. The Association Between Circulating Inflammatory Markers and the Progression of Alzheimer Disease in Norwegian Memory Clinic Patients With Mild Cognitive Impairment or Dementia. *Alzheimer Dis Assoc Disord.* 2020;34(1):47-53.
- Heidari Z, Moudi B, Mahmoudzadeh Sagheb H, Moudi M. Association of TNF- α Gene Polymorphisms with Production of Protein and Susceptibility to Chronic Hepatitis B Infection in the South East Iranian Population. *Hepat Mon.* 2016;16(11):e41984.

- Henderson VW. Estrogen-containing hormone therapy and Alzheimer's disease risk: understanding discrepant inferences from observational and experimental research. *Neuroscience*. 2006;138(3):1031-1039.
- Heneka MT, Carson MJ, El Khoury J, et al. Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Lancet Neurol*. 2015;14(4):388-405.
- Heneka MT, Sastre M, Dumitrescu-Ozimek L, et al. Focal glial activation coincides with increased BACE1 activation and precedes amyloid plaque deposition in APP[V717I] transgenic mice. *J Neuroinflammation*. 2005;2:22.
- Hennessy E, Gormley S, Lopez-Rodriguez AB, Murray C, Murray C, Cunningham C. Systemic TNF- α produces acute cognitive dysfunction and exaggerated sickness behavior when superimposed upon progressive neurodegeneration. *Brain Behav Immun*. 2017;59:233-244.
- Henriksen K, O'Bryant S, Hampel H, et al. The future of blood-based biomarkers for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*. 2014;10(1):115-131.
- Hippius H, Neundörfer G. The discovery of Alzheimer's disease. *Dialogues Clin Neurosci*. 2003;5(1):101-108.
- Holdsworth SR, Gan PY. Cytokines: Names and Numbers You Should Care About. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2015;10(12):2243-2254.
- Holmes C, Cunningham C, Zotova E, Culliford D, Perry VH. Proinflammatory cytokines, sickness behavior, and Alzheimer disease. *Neurology*. 2011;77(3):212-218.
- Holmes C, Cunningham C, Zotova E, et al. Systemic inflammation and disease progression in Alzheimer disease. *Neurology*. 2009;73(10):768-774.
- Hong S, Beja-Glasser VF, Nfonoyim BM, et al. Complement and microglia mediate early synapse loss in Alzheimer mouse models. *Science*. 2016;352(6286):712-716.
- Howe E. Clinical implications of the new diagnostic guidelines for dementia. *Innov Clin Neurosci*. 2013;10(5-6):32-38.
- Howick J. Aulus Cornelius Celsus and 'empirical' and 'dogmatic' medicine. *J R Soc Med*. 2016;109(11):426-430.
- Hsiao YH, Chang CH, Gean PW. Impact of social relationships on Alzheimer's memory impairment: mechanistic studies. *J Biomed Sci*. 2018;25(1):3.
- Hua Y, Guo X, Huang Q, Kong Y, Lu X. Association between interleukin-6 -174G/C polymorphism and the risk of Alzheimer's disease: a meta-analysis. *Int J Neurosci*. 2013;123(9):626-635.

- Hua Y, Zhao H, Kong Y, Lu X. Meta-analysis of the association between the interleukin-1A -889C/T polymorphism and Alzheimer's disease. *J Neurosci Res.* 2012;90(9):1681-1692.
- Huang Y, Mahley RW. Apolipoprotein E: structure and function in lipid metabolism, neurobiology, and Alzheimer's diseases. *Neurobiol Dis.* 2014;72 Pt A:3-12.
- Hugo J, Ganguli M. Dementia and cognitive impairment: epidemiology, diagnosis, and treatment. *Clin Geriatr Med.* 2014;30(3):421-442.
- Huizinga TW, Westendorp RG, Bollen EL, et al. TNF-alpha promoter polymorphisms, production and susceptibility to multiple sclerosis in different groups of patients. *J Neuroimmunol.* 1997;72(2):149-153.
- Iqbal K, Liu F, Gong CX, Grundke-Iqbal I. Tau in Alzheimer disease and related tauopathies. *Curr Alzheimer Res.* 2010;7(8):656-664.
- Irish M, Piguet O. The pivotal role of semantic memory in remembering the past and imagining the future. *Front Behav Neurosci.* 2013;7:27.
- Issaq HJ, Xiao Z, Veenstra TD. Serum and plasma proteomics. *Chemical Reviews.* 2007;107(8):3601-3620.
- Italiani P, Puxeddu I, Napoletano S, et al. Circulating levels of IL-1 family cytokines and receptors in Alzheimer's disease: new markers of disease progression?. *J Neuroinflammation.* 2018;15(1):342.
- Jack CR Jr, Holtzman DM. Biomarker modeling of Alzheimer's disease. *Neuron.* 2013;80(6):1347-1358.
- Jagust WJ, Zheng L, Harvey DJ, et al. Neuropathological basis of magnetic resonance images in aging and dementia. *Ann Neurol.* 2008;63(1):72-80.
- Janelins MC, Mastrangelo MA, Park KM, et al. Chronic neuron-specific tumor necrosis factor-alpha expression enhances the local inflammatory environment ultimately leading to neuronal death in 3xTg-AD mice. *Am J Pathol.* 2008;173(6):1768-1782.
- Jaturapatporn D, Isaac MG, McCleery J, Tabet N. Aspirin, steroidal and non-steroidal anti-inflammatory drugs for the treatment of Alzheimer's disease. *Cochrane Database Syst Rev.* 2012;(2):CD006378.
- Jun TY, Pae CU, Hoon H, et al. Possible association between-G308A tumour necrosis factor-alpha gene polymorphism and major depressive disorder in the Korean population. *Psychiatr Genet.* 2003;13(3):179-181.
- Kamboh MI. Molecular genetics of late-onset Alzheimer's disease. *Ann Hum Genet.* 2004;68(Pt 4):381-404.

- Kandimalla R, Reddy PH. Therapeutics of Neurotransmitters in Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis.* 2017;57(4):1049-1069.
- Kang HJ, Kim JM, Kim SW, et al. Associations of cytokine genes with Alzheimer's disease and depression in an elderly Korean population. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2015;86(9):1002-1007.
- Kassner SS, Bonaterra GA, Kaiser E, et al. Novel systemic markers for patients with Alzheimer disease? – a pilot study. *Curr Alzheimer Res.* 2008;5(4):358-366.
- Kawaguchi Y, Tochimoto A, Hara M, et al. Contribution of single nucleotide polymorphisms of the IL1A gene to the cleavage of precursor IL-1alpha and its transcription activity. *Immunogenetics.* 2007;59(6):441-448.
- Kessler RC, McGonagle KA, Swartz M, Blazer DG, Nelson CB. Sex and depression in the National Comorbidity Survey. I: Lifetime prevalence, chronicity and recurrence. *J Affect Disord.* 1993;29(2-3):85-96.
- Khalil AH, El Missiry AG, Mohamed NR, El Hamrawi LG, Rajab AZ, AbdEl Aty AF. Tumor necrosis factor- α -308 G/A polymorphism in a sample of Egyptian patients with Alzheimer's disease. *Egypt J Psychiatr* 2015;36:88-94.
- Khemka VK, Ganguly A, Bagchi D, et al. Raised serum proinflammatory cytokines in Alzheimer's disease with depression. *Aging Dis.* 2014;5(3):170-176.
- Kim JW, Stewart R, Kang HJ, et al. Longitudinal Associations Between Serum Cytokine Levels and Dementia. *Front Psychiatry.* 2018;9:606.
- Kim SM, Song J, Kim S, et al. Identification of peripheral inflammatory markers between normal control and Alzheimer's disease. *BMC Neurol.* 2011;11:51.
- King E, O'Brien JT, Donaghy P, et al. Peripheral inflammation in prodromal Alzheimer's and Lewy body dementias. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2018;89(4):339-345.
- Kiyota T, Ingraham KL, Swan RJ, Jacobsen MT, Andrews SJ, Ikezu T. AAV serotype 2/1-mediated gene delivery of anti-inflammatory interleukin-10 enhances neurogenesis and cognitive function in APP+PS1 mice. *Gene Ther.* 2012;19(7):724-733.
- Knopman DS, Caselli RJ. Appraisal of cognition in preclinical Alzheimer's disease: a conceptual review. *Neurodegener Dis Manag.* 2012;2(2):183-195.
- Knopman DS, Petersen RC. Mild cognitive impairment and mild dementia: a clinical perspective. *Mayo Clin Proc.* 2014;89(10):1452-1459.
- Koch AE, Kunkel SL, Strieter RM. Cytokines in rheumatoid arthritis. *J Invest Med* 1995;43:28-38.

- Lai KSP, Liu CS, Rau A, et al. Peripheral inflammatory markers in Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis of 175 studies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2017;88(10):876-882.
- Lambert JC, Ibrahim-Verbaas CA, Harold D, et al. Meta-analysis of 74,046 individuals identifies 11 new susceptibility loci for Alzheimer's disease. *Nat Genet*. 2013;45(12):1452-1458.
- Langa KM, Larson EB, Crimmins EM, et al. A Comparison of the Prevalence of Dementia in the United States in 2000 and 2012. *JAMA Intern Med*. 2017;177(1):51-58.
- Lanoiselée HM, Nicolas G, Wallon D, et al. APP, PSEN1, and PSEN2 mutations in early-onset Alzheimer disease: A genetic screening study of familial and sporadic cases. *PLoS Med*. 2017;14(3):e1002270.
- Laws SM, Pernecky R, Wagenpfeil S, et al. TNF polymorphisms in Alzheimer disease and functional implications on CSF beta-amyloid levels. *Hum Mutat*. 2005;26(1):29-35.
- Lee YH, Choi SJ, Ji JD, Song GG. Association between TNF- α promoter -308 A/G polymorphism and Alzheimer's disease: a meta-analysis. *Neurol Sci*. 2015;36(6):825-832.
- Lee YS, Danandeh A, Baratta J, Lin CY, Yu J, Robertson RT. Neurotrophic factors rescue basal forebrain cholinergic neurons and improve performance on a spatial learning test. *Exp Neurol*. 2013;249:178-186.
- Letenneur L, Launer LJ, Andersen K, et al. Education and the risk for Alzheimer's disease: sex makes a difference. EURODEM pooled analyses. EURODEM Incidence Research Group. *Am J Epidemiol*. 2000;151(11):1064-1071.
- Leung R, Proitsi P, Simmons A, et al. Inflammatory proteins in plasma are associated with severity of Alzheimer's disease. *PLoS One*. 2013;8(6):e64971.
- Li BH, Zhang LL, Yin YW, et al. Association between interleukin-1 α C(-889)T polymorphism and Alzheimer's disease: a meta-analysis including 12,817 subjects. *J Neural Transm (Vienna)*. 2013;120(3):497-506.
- Li R, Singh M. Sex differences in cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Front Neuroendocrinol*. 2014;35(3):385-403.
- Li Y, Liu L, Barger SW, Griffin WS. Interleukin-1 mediates pathological effects of microglia on tau phosphorylation and on synaptophysin synthesis in cortical neurons through a p38-MAPK pathway *J Neurosci*. 2003;23(5):1605-1611.
- Lima-Oliveira G, Lippi G, Salvagno GL, Picheth G, Guidi GC. Laboratory Diagnostics and Quality of Blood Collection. *J Med Biochem*. 2015;34(3):288-294.

- Lin FC, Chuang YS, Hsieh HM, et al. Early Statin Use and the Progression of Alzheimer Disease: A Total Population-Based Case-Control Study. *Medicine (Baltimore)*. 2015;94(47):e2143.
- Lin FC, Young HA. Interferons: Success in anti-viral immunotherapy. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2014;25(4):369-376.
- Lin X, Koelsch G, Wu S, Downs D, Dashti A, Tang J. Human aspartic protease memapsin 2 cleaves the beta-secretase site of beta-amyloid precursor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(4):1456-1460.
- Lio D, Annoni G, Licastro F, et al. Tumor necrosis factor-alpha -308A/G polymorphism is associated with age at onset of Alzheimer's disease. *Mech Ageing Dev*. 2006;127(6):567-571.
- Lio D, Licastro F, Scola L, et al. Interleukin-10 promoter polymorphism in sporadic Alzheimer's disease. *Genes Immun*. 2003;4(3):234-238.
- Lista S, Faltraco F, Hampel H. Biological and methodological challenges of blood-based proteomics in the field of neurological research. *Prog Neurobiol*. 2013;101-102:18-34.
- Liu F, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Gong CX. Contributions of protein phosphatases PP1, PP2A, PP2B and PP5 to the regulation of tau phosphorylation. *Eur J Neurosci*. 2005;22(8):1942-1950.
- Liu Z, Guo J, Wang Y, et al. Lack of association between IL-10 and IL-18 gene promoter polymorphisms and Parkinson's disease with cognitive impairment in a Chinese population. *Sci Rep*. 2016;6:19021.
- Lobo-Silva D, Carriche GM, Castro AG, Roque S, Saraiva M. Balancing the immune response in the brain: IL-10 and its regulation. *J Neuroinflammation*. 2016;13(1):297.
- Lopez OL. Mild cognitive impairment. *Continuum (Minneap Minn)*. 2013;19(2 Dementia):411-424.
- Luckheeram RV, Zhou R, Verma AD, Xia B. CD4⁺T cells: differentiation and functions. *Clin Dev Immunol*. 2012;2012:925135.
- Lue LF, Kuo YM, Roher AE et al. Soluble amyloid beta peptide concentration as a predictor of synaptic change in Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 1999;155(3):853-862.
- Lue LF, Rydel R, Brigham EF, et al. Inflammatory repertoire of Alzheimer's disease and nondemented elderly microglia in vitro. *Glia*. 2001;35(1):72-79.
- Ma SL, Tang NL, Lam LC, Chiu HF. The association between promoter polymorphism of the interleukin-10 gene and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2005;26(7):1005-1010.

- Magalhães CA, Carvalho MDG, Sousa LP, Caramelli P, Gomes KB. Alzheimer's disease and cytokine IL-10 gene polymorphisms: Is there an association? *Arq. Neuropsiquiatr.* 2017;75(9):649-656.
- Malnar M, Košiček M, Hećimović S. Alzheimerova bolest: od molekularnog mehanizma do rane dijagnoze. *Medicina-glasilo Hrvatskoga liječničkoga zbora, Podružnica Rijeka.* 2009; 45(3):234-243.
- Mandrekar-Colucci S, Landreth GE. Microglia and inflammation in Alzheimer's disease. *CNS Neurol Disord Drug Targets.* 2010;9(2):156-167.
- Manoochehri M, Kamali K, Rahgozar M, Ohadi M, Farrokhi H, Khorshid HR. Lack of Association between Tumor Necrosis Factor-alpha -308 G/A Polymorphism and Risk of Developing Late-Onset Alzheimer's Disease in an Iranian Population. *Avicenna J Med Biotechnol.* 2009;1(3):193-197.
- Marksteiner J, Kemmler G, Weiss EM, et al. Five out of 16 plasma signaling proteins are enhanced in plasma of patients with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 2011; 32(3): 539-540.
- Martin L, Latypova X, Terro F. Post-translational modifications of tau protein: implications for Alzheimer's disease. *Neurochem Int.* 2011;58(4):458-471.
- Matsushima K, Akahoshi T, Yamada M, Furutani Y, Oppenheim JJ. Properties of a specific interleukin 1 (IL 1) receptor on human Epstein Barr virus-transformed B lymphocytes: identity of the receptor for IL 1-alpha and IL 1-beta. *J Immunol* 1986;136(12):4496-4502.
- Matthews FE, Stephan BC, Robinson L, et al. A two decade dementia incidence comparison from the Cognitive Function and Ageing Studies I and II. *Nat Commun* 2016; 7:11398.
- McAlpine FE, Tansey MG. Neuroinflammation and tumor necrosis factor signaling in the pathophysiology of Alzheimer's disease. *J Inflamm Res.* 2008;1:29-39.
- McGeer PL, Rogers J, McGeer EG. Inflammation, antiinflammatory agents, and Alzheimer's disease: the last 22 years. *J Alzheimers Dis.* 2016; 54(3):853-857.
- Meador BM, Krzysztoson CP, Johnson RW, Huey KA. Effects of IL-10 and age on IL-6, IL-1 β , and TNF- α responses in mouse skeletal and cardiac muscle to an acute inflammatory insult. *J Appl Physiol.* 2008;104(4):991-997.
- Medway C, Combarros O, Cortina-Borja M, et al. The sex-specific associations of the aromatase gene with Alzheimer's disease and its interaction with IL10 in the Epistasis Project. *Eur J Hum Genet.* 2014;22(2):216-220.
- Mendez MF. Early-Onset Alzheimer disease. *Neurol Clin.* 2017;35(2):263-281.

- Menza M, Dobkin RD, Marin H, et al. The role of inflammatory cytokines in cognition and other non-motor symptoms of Parkinson's disease. *Psychosomatics*. 2010;51(6):474-479.
- Meramat A, Rajab NF, Shahar S, Sharif R. Cognitive impairment, genomic instability and trace elements. *J Nutr Health Aging*. 2015;19(1):48-57.
- Michaud M, Balardy L, Moulis G, et al. Proinflammatory cytokines, aging, and age-related diseases. *J Am Med Dir Assoc*. 2013;14(12):877-882.
- Mielke MM, Vemuri P, Rocca WA. Clinical epidemiology of Alzheimer's disease: assessing sex and gender differences. *Clin Epidemiol*. 2014;6:37-48.
- Mielke MM. Sex and Gender Differences in Alzheimer's Disease Dementia. *Psychiatr Times*. 2018;35(11):14-17.
- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*. 1988;16(3):1215.
- Mischak H, Apweiler R, Banks RE, et al. Clinical proteomics: A need to define the field and to begin to set adequate standards. *Proteomics Clin Appl*. 2007;1(2):148-156.
- Mohamad NV, Wong SK, Wan Hasan WN, et al. The relationship between circulating testosterone and inflammatory cytokines in men. *Aging Male*. 2019;22(2):129-140.
- Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol*. 2001;19:683-765.
- Moraes CF, Benedet AL, Souza VC, et al. Cytokine gene polymorphisms and Alzheimer's disease in Brazil. *Neuroimmunomodulation*. 2013;20:239-246.
- Mosconi L, Berti V, Swerdlow RH, Pupi A, Duara R, de Leon M. Maternal transmission of Alzheimer's disease: prodromal metabolic phenotype and the search for genes. *Hum Genomics*. 2010;4(3):170-193.
- Mrak RE, Griffin WS. Interleukin-1 and the immunogenetics of Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2000;59(6):471-476.
- Mun MJ, Kim JH, Choi JY, Jang WC. Genetic polymorphisms of interleukin genes and the risk of Alzheimer's disease: an update meta-analysis. *Meta Gene*. 2016;8:1-10.
- Mungas D, Jagust WJ, Reed BR, et al. MRI predictors of cognition in subcortical ischemic vascular disease and Alzheimer's disease. *Neurology*. 2001;57(12):2229-2235.
- Murman DL. The Impact of Age on Cognition. *Semin Hear*. 2015;36(3):111-121.
- Murray CL, Obiang P, Bannerman D, Cunningham C. Endogenous IL-1 in cognitive function and anxiety: a study in IL-1RI^{-/-} mice. *PLoS One*. 2013;8(10):e78385.

- Naderali EK, Ratcliffe SH, Dale MC. Obesity and Alzheimer's disease: a link between body weight and cognitive function in old age. *Am J Alzheimers Dis Other Demen.* 2009;24(6):445-449.
- Nagae T, Araki K, Shimoda Y, Sue LI, Beach TG, Konishi Y. Cytokines and Cytokine Receptors Involved in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. *J Clin Cell Immunol.* 2016;7(4):441.
- Nelson PT, Head E, Schmitt FA, et al. Alzheimer's disease is not “brain aging”: neuropathological, genetic, and epidemiological human studies. *Acta Neuropathol.* 2011;121(5):571-587.
- Neta R, Sayers TJ, Oppenheim JJ. Relationship of TNF to interleukins. *Immunol Ser.* 1992;56:499-566.
- Neugroschl J, Wang S. Alzheimer's disease: diagnosis and treatment across the spectrum of disease severity. *Mt Sinai J Med.* 2011;78(4):596-612.
- Ng A, Tam WW, Zhang MW, et al. Ho IL-1 β , IL-6, TNF- α and CRP in elderly patients with depression or Alzheimer's disease: Systematic review and meta-analysis. *Sci Rep.* 2018;8(1): 12050.
- Nicoll JA, Mrazek RE, Graham DI, et al. Association of interleukin-1 gene polymorphisms with Alzheimer's disease. *Ann Neurol.* 2000;47(3):365-368.
- Nie K, Zhang Y, Gan R, et al. Polymorphisms in immune/inflammatory cytokine genes are related to Parkinson's disease with cognitive impairment in the Han Chinese population. *Neurosci Lett.* 2013;541:111-115.
- Noble W, Hanger DP, Miller CC, Lovestone S. The importance of tau phosphorylation for neurodegenerative diseases. *Front Neurol.* 2013;4:83.
- O'Bryant SE, Gupta V, Henriksen K, et al. Guidelines for the standardization of preanalytic variables for blood-based biomarker studies in Alzheimer's disease research. *Alzheimers Dement.* 2015;11(5):549-560.
- O'Conner DW, Pollitt PA, Treasure FP, Brooks CP, Reiss BB. The influence of education, social class, and sex on Mini-Mental State scores. *PsycholMed.* 1989;19(3):771-776.
- Okin D, Medzhitov R. Evolution of inflammatory diseases. *Curr Biol.* 2012;22(17):R733-R740.
- Ownby RL, Crocco E, Acevedo A, et al. Depression and risk for Alzheimer disease: systematic review, meta-analysis, and metaregression analysis. *Arch Gen Psychiatry.* 2006;63(5):530-538.

- Palsetia D, Rao GP, Tiwari SC, Lodha P, De Sousa A. The Clock Drawing Test versus Mini-mental Status Examination as a Screening Tool for Dementia: A Clinical Comparison. *Indian J Psychol Med.* 2018;40(1):1-10.
- Pankratz VS, Roberts RO, Mielke MM, et al. Predicting the risk of mild cognitive impairment in the Mayo Clinic Study of Aging. *Neurology.* 2015;84(14):1433-1442.
- Park JC, Han SH, Mook-Jung I. Peripheral inflammatory biomarkers in Alzheimer's disease: a brief review. *BMB Rep.* 2020;53(1):10-19.
- Pećina-Šlaus N, Nikuševa Martić T, Perić J. *Odabrane metode molekularne biologije*, Zagreb, Medicinska naklada; 2009.
- Pernecky R, Drzezga A, Diehl-Schmid J, Li Y, Kurz A. Gender differences in brain reserve: an (18)F-FDG PET study in Alzheimer's disease. *J Neurol.* 2007;254(10):1395-1400.
- Peters R. Ageing and the brain. *Postgrad Med J.* 2006;82(964):84-88.
- Petersen RC, Smith GE, Waring SC, Ivnik RJ, Tangalos EG, Kokmen E. Mild Cognitive Impairment Clinical Characterization and Outcome. *Arch Neurol.* 1999;56(3):303-308.
- Plassman BL, Langa KM, Fisher GG, et al. Prevalence of dementia in the United States: the aging, demographics, and memory study. *Neuroepidemiology.* 2007;29(1-2):125-132.
- Ponjoan A, Garre-Olmo J, Blanch J, et al. Epidemiology of dementia: prevalence and incidence estimates using validated electronic health records from primary care. *Clin Epidemiol.* 2019;11:217-228.
- Pradier C, Sakarovitch C, Le Duff F, et al. The mini mental state examination at the time of Alzheimer's disease and related disorders diagnosis, according to age, education, gender and place of residence: a cross-sectional study among the French National Alzheimer database. *PLoS One.* 2014;9(8):e103630.
- Probert L. TNF and its receptors in the CNS: The essential, the desirable and the deleterious effects. *Neuroscience.* 2015;302:2-22.
- Qidwai T, Khan F. Tumour necrosis factor gene polymorphism and disease prevalence. *Scand J Immunol.* 2011;74(6):522-547.
- Qin X, Peng Q, Zeng Z, et al. Interleukin-1A -889C/T polymorphism and risk of Alzheimer's disease: a meta-analysis based on 32 case-control studies. *J Neurol.* 2012;259:1519-1529.
- Qiu C, Kivipelto M, von Strauss E. Epidemiology of Alzheimer's disease: occurrence, determinants, and strategies toward intervention. *Dialogues Clin Neurosci.* 2009;11(2):111-128.
- Querfurth HW, LaFerla FM. Alzheimer's disease. *N Engl J Med.* 2010;362(4):329-344.

- Rai AJ, Gelfand CA, Haywood BC, et al. HUPO Plasma Proteome Project specimen collection and handling: Towards the standardization of parameters for plasma proteome samples. *Proteomics*. 2005;5(13):3262-3277.
- Rai AJ, Vitzthum F. Effects of preanalytical variables on peptide and protein measurements in human serum and plasma: Implications for clinical proteomics. *Expert Rev Proteomics*. 2006;3(4):409-426.
- Raji CA, Lopez OL, Kuller LH, Carmichael OT, Becker JT. Age, Alzheimer disease, and brain structure. *Neurology*. 2009;73(22):1899-1905.
- Ramos EM, Lin MT, Larson EB, et al. Tumor necrosis factor alpha and interleukin 10 promoter region polymorphisms and risk of late-onset Alzheimer disease. *Arch Neurol*. 2006;63(8):1165-1169.
- Ravi S. Dementia Mortality: Estimates of survival after the onset of dementia range from 4 to 12 years. *Indian J Psychiatry*. 2011;53(2):178-179.
- Ray S, Britschgi M, Herbert C, et al. Classification and prediction of clinical Alzheimer's diagnosis based on plasma signaling proteins. *Nat Med*. 2007;13(11):1359-1362.
- Rea IM, Gibson DS, McGilligan V, McNerlan SE, Alexander HD, Ross OA. Age and Age-Related Diseases: Role of Inflammation Triggers and Cytokines. *Front Immunol*. 2018;9:586.
- Rees LE, Wood NA, Gillespie KM, Lai KN, Gaston K, Mathieson PW. The interleukin-10-1082 G/A polymorphism: allele frequency in different populations and functional significance. *Cell Mol Life Sci*. 2002;59(3):560-569.
- Reisberg B, Ferris S, de Leon MJ. Stage-specific behavioral, cognitive, and in vivo changes in community residing subjects with age-associated memory impairment and primary degenerative dementia of the Alzheimer type. *Drug Dev Res* 1988;15(2):101-114.
- Reitz C, Brayne C, Mayeux R. Epidemiology of Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol*. 2011;7(3):137-152.
- Ribizzi G, Fiordoro S, Barocci S, Ferrari E, Megna M. Cytokine polymorphisms and Alzheimer disease: possible associations. *Neurol Sci*. 2010;31(3):321-325.
- Richwine AF, Sparkman NL, Dilger RN, Buchanan JB, Johnson RW. Cognitive deficits in interleukin-10-deficient mice after peripheral injection of lipopolysaccharide. *Brain Behav Immun*. 2009;23(6):794-802.
- Rocca WA, Mielke MM, Vemuri P, et al.: Sex and gender differences in the causes of dementia: a narrative review. *Maturitas*. 2014; 79(2):196-201.

- Rocca WA: Time, Sex, Gender, History, and Dementia. *Alzheimer Dis Assoc Disord.* 2017;31(1):76-79.
- Roque S, Correia-Neves M, Mesquita AR, Palha JA, Sousa N. Interleukin-10: a key cytokine in depression?. *Cardiovasc Psychiatry Neurol.* 2009;2009:187894.
- Rota E, Bellone G, Rocca P, Bergamasco B, Emanuelli G, Ferrero P. Increased intrathecal TGF-beta1, but not IL-12, IFN-gamma and IL-10 levels in Alzheimer's disease patients. *Neurol Sci.* 2006;27(1):33-39.
- Rubin EH, Storandt M, Miller JP, et al. A Prospective Study of Cognitive Function and Onset of Dementia in Cognitively Healthy Elders. *Arch Neurol.* 1998;55(3):395-401.
- Rubio-Perez JM, Morillas-Ruiz JM. A review: inflammatory process in Alzheimer's disease, role of cytokines. *ScientificWorldJournal.* 2012;2012:756357.
- Russ TC, Stamatakis E, Hamer M, et al. Socioeconomic status as a risk factor for dementia death: individual participant meta-analysis of 86 508 men and women from the UK. *Br J Psychiatry* 2013; 203(1):10-17.
- Safieh M, Korczyn AD, Michaelson DM. ApoE4: an emerging therapeutic target for Alzheimer's disease. *BMC Med.* 2019;17(1):64.
- Sajja VS, Hlavac N, VandeVord PJ. Role of Glia in Memory Deficits Following Traumatic Brain Injury: Biomarkers of Glia Dysfunction. *Front Integr Neurosci.* 2016;10:7.
- Salomon BL, Leclerc M, Tosello J, Ronin E, Piaggio E, Cohen JL. Tumor Necrosis Factor α and Regulatory T Cells in Oncoimmunology. *Front Immunol.* 2018;9:444.
- Sathyan S, Barzilai N, Atzmon G, Milman S, Ayers E, Verghese J. Association of anti-inflammatory cytokine IL10 polymorphisms with motoric cognitive risk syndrome in an Ashkenazi Jewish population. *Neurobiol Aging.* 2017;58:238.e1-238.e8.
- Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel D, et al. Association of apolipoprotein E allele epsilon 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease. *Neurology.* 1993;43(8):1467-1472.
- Schindler SE, Fagan AM. Autosomal Dominant Alzheimer Disease: A Unique Resource to Study CSF Biomarker Changes in Preclinical AD. *Front Neurol.* 2015;6:142.
- Schmid-Schönbein GW. Analysis of inflammation. *Annu Rev Biomed Eng.* 2006;8:93-131.
- Schmidt MF, Freeman KB, Windham BG, et al. Associations between serum inflammatory markers and hippocampal volume in a community sample. *J Am Geriatr Soc.* 2016;64:1823-1829.

- Schmidt R, Schmidt H, Curb JD, Masaki K, White LR, Launer LJ. Early inflammation and dementia: a 25-year follow-up of the Honolulu-Asia Aging Study. *Ann Neurol.* 2002;52(2):168-174.
- Serrano JP, Latorre JM, Gatz M. Spain: promoting the welfare of older adults in the context of population aging. *Gerontologist.* 2014;54(5):733-740.
- Serretti A, Olgiati P, Politis A, et al. Lack of association between interleukin-1 alpha rs1800587 polymorphism and Alzheimer's disease in two Independent European samples. *J Alzheimers Dis.* 2009;16(1):181-187.
- Seshadri S, Wolf PA, Beiser A, et al. Lifetime risk of dementia and Alzheimer's disease. The impact of mortality on risk estimates in the Framingham Study. *Neurology.* 1997;49(6):1498-1504.
- Shen L, Jia J. An Overview of Genome-Wide Association Studies in Alzheimer's Disease. *Neurosci Bull.* 2016;32(2):183-190.
- Sheng JG, Jones RA, Zhou XQ, et al. Interleukin-1 promotion of MAPK-p38 overexpression in experimental animals and in Alzheimer's disease: potential significance for tau protein phosphorylation. *Neurochem Int.* 2001;39(5-6):341-348.
- Sheng JG, Mrazek RE, Griffin WST. Distribution of interleukin1-immunoreactive microglia in cerebral cortical layers: implications for neuritic plaque formation in Alzheimer's disease. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1998;24(4):278-283.
- Sheng M, Sabatini BL, Südhof TC. Synapses and Alzheimer's disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2012;4(5):a005777.
- Sheppard O, Plattner F, Rubin A, et al. Altered regulation of tau phosphorylation in a mouse model of down syndrome aging. *Neurobiol Aging.* 2012;33(4):828.e31-828.e8.28E44.
- Sjögren T, Larsson T. The changing age-structure in Sweden and its impact on mental illness. *Bull World Health Organ.* 1959;21(4-5):569-582.
- Skelly DT, Griffin ÉW, Murray CL, et al. Acute transient cognitive dysfunction and acute brain injury induced by systemic inflammation occur by dissociable IL-1-dependent mechanisms. *Mol Psychiatry.* 2019;24(10):1533-1548.
- Smebye KL, Kirkevold M, Engedal K. How do persons with dementia participate in decision making related to health and daily care? a multi-case study. *BMC Health Serv Res.* 2012;12:241.
- Sondag CM, Dhawan G, Combs CK. Beta amyloid oligomers and fibrils stimulate differential activation of primary microglia. *J Neuroinflammation.* 2009;6:1.

- Sperling RA, Aisen PS, Beckett LA, 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. *Alzheimers Dement.* 2011;7(3):280-292.
- Sproston NR, Ashworth JJ. Role of C-Reactive Protein at Sites of Inflammation and Infection. *Front Immunol.* 2018;9:754.
- Stefani M, Rigacci S. Protein folding and aggregation into amyloid: the interference by natural phenolic compounds. *Int J Mol Sci.* 2013;14(6):12411-12457.
- Stricker NH, Chang YL, Fennema-Notestine C, et al. Distinct profiles of brain and cognitive changes in the very old with Alzheimer disease. *Neurology.* 2011;77(8):713-721.
- Strle K, Zhou JH, Shen WH, et al. Interleukin-10 in the brain. *Crit Rev Immunol.* 2001;21(5):427-449.
- Su F, Bai F, Zhang Z. Inflammatory Cytokines and Alzheimer's Disease: A Review from the Perspective of Genetic Polymorphisms. *Neurosci Bull.* 2016;32(5):469-480.
- Su HI, Freeman EW. Hormone changes associated with the menopausal transition. *Minerva Ginecol.* 2009;61(6):483-489.
- Suárez A, Castro P, Alonso R, Mozo L, Gutiérrez C. Interindividual variations in constitutive interleukin-10 messenger RNA and protein levels and their association with genetic polymorphisms. *Transplantation.* 2003;75(5):711-717.
- Sultani M, Stringer AM, Bowen JM, Gibson RJ. Anti-inflammatory cytokines: important immunoregulatory factors contributing to chemotherapy-induced gastrointestinal mucositis. *Chemother Res Pract.* 2012;2012:490804.
- Sunderland T, Hill JL, Mellow AM, et al. Clock drawing in Alzheimer's disease. A novel measure of dementia severity. *J Am Geriatr Soc.* 1989;37(8):725-729.
- Szelényi J. Cytokines and the central nervous system. *Brain Res Bull.* 2001;54(4):329-338.
- Taipa R, das Neves SP, Sousa AL, et al. Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines in the CSF of patients with Alzheimer's disease and their correlation with cognitive decline. *Neurobiol Aging.* 2019;76:125-132.
- Tanzi RE. The genetics of Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012;2(10):a006296.
- Tavares IA, Touma D, Lynham S, et al. Prostate-derived sterile 20-like kinases (PSKs/TAOKs) phosphorylate tau protein and are activated in tangle-bearing neurons in Alzheimer disease. *J Biol Chem.* 2013;288(21):15418-15429.

- Tedde A, Putignano AL, Nacmias B, Bagnoli S, Cellini E, Sorbi S. Lack of association between TNF-alpha polymorphisms and Alzheimer's disease in an Italian cohort. *Neurosci Lett*. 2008;446(2-3):139-142.
- Tegeler C, O'Sullivan JL, Bucholtz N, et al. The inflammatory markers CRP, IL-6, and IL-10 are associated with cognitive function-data from the Berlin Aging Study II. *Neurobiol Aging*. 2016;38:112-117.
- Ter Horst R, Jaeger M, Smeekens SP, et al. Host and Environmental Factors Influencing Individual Human Cytokine Responses. *Cell*. 2016;167(4):1111-1124.e13.
- Thackray AM, Bujdoso R, "A role for pro- and anti-inflammatory cytokines in the regulation of prion disease pathogenesis". *Immunology*. 2004;113(S1)98-137.
- Thinakaran G. The role of presenilins in Alzheimer's disease. *J Clin Invest*. 1999;104(10):1321-1327.
- Thornton C, Bright NJ, Sastre M, Muckett PJ, Carling D. AMP-activated protein kinase (AMPK) is a tau kinase, activated in response to amyloid beta-peptide exposure. *Biochem J*. 2011; 434(3):503-512.
- Tian M, Deng YY, Hou DR, Li W, Feng XL, Yu ZL. Association of IL-1, IL-18, and IL-33 gene polymorphisms with late-onset Alzheimer's disease in a Hunan Han Chinese population. *Brain Res*. 2015;1596:136-145.
- Tobinick E, Gross H, Weinberger A, Cohen H. TNF-alpha modulation for treatment of Alzheimer's disease: a 6-month pilot study. *MedGenMed*. 2006;8(2):25.
- Tomaskova H, Kuhnova J, Cimler R, Dolezal O, Kuca K. Prediction of population with Alzheimer's disease in the European Union using a system dynamics model. *Neuropsychiatr Dis Treat*. 2016;12:1589-1598.
- Tönnies E, Trushina E. Oxidative Stress, Synaptic Dysfunction, and Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis*. 2017;57(4):1105-1121.
- Turner DM, Williams DM, Sankaran D, Lazarus M, Sinnott PJ, Hutchinson IV. An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter. *Eur J Immunogenet*. 1997;24(1):1-8.
- Uçeyler N, Valenza R, Stock M, Schedel R, Sprotte G, Sommer C. Reduced levels of antiinflammatory cytokines in patients with chronic widespread pain. *Arthritis Rheum*. 2006;54(8):2656-2664.
- Um JY, Moon KS, Lee KM, Kim HM. Interleukin-1 gene cluster polymorphisms in cerebral infarction. *Cytokine*. 2003;23(1-2):41-46.

- Um JY, Rim HK, Kim SJ, Kim HL, Hong SH. Functional polymorphism of IL-1 alpha and its potential role in obesity in humans and mice. *PLoS One*. 2011;6(12):e29524.
- Uslu S, Akarkarasu ZE, Ozbabalik D, et al. Levels of amyloid beta-42, interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha in Alzheimer's disease and vascular dementia. *Neurochem Res*. 2012;37(7):1554-1559.
- Valenti L, Fracanzani AL, Dongiovanni P, et al. Tumor necrosis factor alpha promoter polymorphisms and insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology*. 2002;122(2):274-280.
- Van Den Heuvel C, Thornton E, Vink R. Traumatic brain injury and Alzheimer's disease: a review. *Prog Brain Res*. 2007;161:303-316.
- Vargas-Alarcón G, Juárez-Cedillo E, Martínez-Rodríguez N, Fragoso JM, García-Hernández N, Juárez-Cedillo T. Association of interleukin-10 polymorphisms with risk factors of Alzheimer's disease and other dementias (SADEM study). *Immunol Lett*. 2016;177:47-52.
- Vargha A, Delaney HD. A critique and improvement of the CL common language effect size statistics of McGraw and Wong. *J Educ Behav Stat*. 2000;25(2):101-132.
- Vermeer SE, Koudstaal PJ, Oudkerk M, Hofman A, Breteler MM. Prevalence and risk factors of silent brain infarcts in the population-based Rotterdam Scan Study. *Stroke*. 2002;33(1):21-25.
- Viña J, Lloret A. Why women have more Alzheimer's disease than men: gender and mitochondrial toxicity of amyloid-beta peptide. *J Alzheimers Dis*. 2010;20 Suppl 2:S527-S533.
- Vlad SC, Miller DR, Kowall NW, Felson DT. Protective effects of NSAIDs on the development of Alzheimer disease. *Neurology*. 2008;70(19):1672-1677.
- Vural P, Değirmencioğlu S, Parildar-Karpuzoğlu H, et al. The combinations of TNFalpha-308 and IL-6 -174 or IL-10 -1082 genes polymorphisms suggest an association with susceptibility to sporadic late-onset Alzheimer's disease. *Acta Neurol Scand*. 2009;120(6):396-401.
- Walker KA, Hoogeveen RC, Folsom AR, et al. Midlife systemic inflammatory markers are associated with late-life brain volume: The ARIC study. *Neurology*. 2017;89(22):2262-2270.
- Wang AH, Lam WJ, Han DY, et al. The effect of IL-10 genetic variation and interleukin 10 serum levels on Crohn's disease susceptibility in a New Zealand population. *Hum Immunol*. 2011;72(5):431-435.

- Wang EH, Hong CJ, Yeh HL, et al. Interleukin-1 alpha (rs1800587) genetic polymorphism is associated with specific cognitive functions but not depression or loneliness in elderly males without dementia. *Neurosci Lett*. 2013;556:69-72.
- Wang T. TNF-alpha G308A polymorphism and the susceptibility to Alzheimer's disease: an updated meta-analysis. *Arch Med Res*. 2015;46(1):24-30 e1.
- Wei X, Chen X, Fontanilla C, et al. C/T conversion alters interleukin-1A promoter function in a human astrocyte cell line. *Life Sci*. 2007;80(12):1152-1156.
- Weinstein G, Beiser AS, Choi SH, et al. Serum brain-derived neurotrophic factor and the risk for dementia: the Framingham Heart Study. *JAMA Neurol*. 2014;71(1):55-61.
- Weiskopf D, Weinberger B, Grubeck-Loebenstien B. The aging of the immune system. *Transpl Int*. 2009;22(11):1041-1050.
- Weller J, Budson A. Current understanding of Alzheimer's disease diagnosis and treatment. *F1000Res*. 2018;7:F1000.
- Wenk GL. Neuropathologic changes in Alzheimer's disease. *J Clin Psychiatry*. 2003;64 Suppl 9:7-10.
- Wichmann MA, Cruickshanks KJ, Carlsson CM, et al. Long-term systemic inflammation and cognitive impairment in a population-based cohort. *J Am Geriatr Soc*. 2014;62(9):1683-1691.
- Wilson AG, de Vries N, Pociot F, di Giovine FS, van der Putte LB, Duff GW. An allelic polymorphism within the human tumor necrosis factor alpha promoter region is strongly associated with HLA A1, B8, and DR3 alleles. *J Exp Med*. 1993;177(2):557-560.
- Wilson AG, Symons JA, McDowell TL, McDevitt HO, Duff GW. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(7):3195-3199.
- Xian X, Jiang Q, McDermott J, Han JDJ. Aging and Alzheimer's disease: Comparison and associations from molecular to system level. *Aging Cell*. 2018;17(5):e12802.
- Xiao H, Gao Y, Liu L, Li Y. Association between polymorphisms in the promoter region of the apolipoprotein E (APOE) gene and Alzheimer's disease: A meta-analysis. *EXCLI J*. 2017;16:921-938.
- Xiao N, Le QT. Neurotrophic Factors and Their Potential Applications in Tissue Regeneration. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2016;64(2):89-99.
- Yang L, Lu R, Jiang L, Liu Z, Peng Y. Expression and genetic analysis of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) G-308A polymorphism in sporadic Alzheimer's disease in a Southern China population. *Brain Res*. 2009;1247:178-181.

- Yasutake C, Kuroda K, Yanagawa T, Okamura T, Yoneda H. Serum BDNF, TNF-alpha and IL-1beta levels in dementia patients: comparison between Alzheimer's disease and vascular dementia. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci.* 2006;256(7):402-406.
- Yeh SS, Schuster MW. Geriatric cachexia: the role of cytokines. *Am J Clin Nutr.* 1999;70(2):183-197.
- Yildiz SH, Erdogan MO, Artan S, et al. Association of Alzheimer's disease with APOE and IL-1 alpha gene polymorphisms. *Am J Alzheimers Dis Other Demen.* 2015;30(8):756-761.
- Yirmiya R, Goshen I. Immune modulation of learning, memory, neural plasticity and neurogenesis. *Brain Behav Immun.* 2011;25(2):181-213.
- Yuzwa SA, Yadav AK, Skorobogatko Y, Clark T, Vosseller K, Vocadlo DJ. Mapping O-GlcNAc modification sites on tau and generation of a site-specific O-GlcNAc tau antibody. *Amino Acids.* 2011; 40(3):857-868.
- Zetterberg H, Burnham SC. Blood-based molecular biomarkers for Alzheimer's disease. *Mol Brain.* 2019;12(1):26.
- Zhang JM, An J. Cytokines, inflammation, and pain. *Int Anesthesiol Clin.* 2007;45(2):27-37.
- Zhang Q, Yao Z, Xu L, Cheng X, Cui T. Association of IL-1 α , IL-1 β , IL-18 and IL-33 genetic variants with the risk of Alzheimer disease in a Chinese population. *Int J Clin Exp Pathol.* 2017;10(2):2127-2134.
- Zhang Y, Zhang J, Tian C, et al. The -1082G/A polymorphism in IL-10 gene is associated with risk of Alzheimer's disease: a meta-analysis. *J Neurol Sci.* 2011;303(1-2):133-138.
- Zhao LR, Piao CS, Murikinati SR, Gonzalez-Toledo ME. The role of stem cell factor and granulocyte-colony stimulating factor in treatment of stroke. *Recent Pat CNS Drug Discov.* 2013;8(1):2-12.
- Zheng C, Zhou XW, Wang JZ. The dual roles of cytokines in Alzheimer's disease: update on interleukins, TNF- α , TGF- β and IFN- γ . *Transl Neurodegener.* 2016;5:7.
- Zuliani G, Guerra G, Ranzini M, et al. High interleukin-6 plasma levels are associated with functional impairment in older patients with vascular dementia. *Int J Geriatr Psychiatry.* 2007;22(4):22:305-311.
- Zuliani G, Ranzini M, Guerra G, et al. Plasma cytokines profile in older subjects with late onset Alzheimer's disease or vascular dementia. *J Psychiatr Res.* 2007;41(8):686-693.

8. SAŽETAK

Neurobiološka podloga AB uključuje neuroupalu i promijenjeno oslobađanje citokina. Cilj ovog istraživanja bio je definirati ulogu citokina IL-1 α , TNF- α i IL-10 u ispitanika s Alzheimerovom bolesti (AB) i ispitanika s blagim kognitivnim poremećajem (MCI). U naše istraživanje bilo je uključeno ukupno 174 ispitanika od kojih je bilo 69 muškaraca i 105 žena: 74 pacijenta imali su dijagnozu AB, a 100 dijagnozu MCI. Utvrđene su značajne razlike u koncentraciji citokina IL-1 α , TNF- α i IL-10 između ispitanika s AB i MCI: ispitanici s AB imali su značajno povišenu koncentraciju TNF- α i značajno sniženu koncentraciju IL-10 i IL-1 α u serumu prema ispitanicima s MCI. Ti su podaci uputili na djelimično potvrđenu hipotezu o neuroupali kao riziku za razvoj AB. Koncentracije citokina nisu bile povezane s kognitivnim simptomima što upućuje da izabrani citokini nisu povezani s kognitivnim propadanjem u AB. Nije utvrđena značajna povezanost između dobi, Testa crtanja sata i MMSE testa s koncentracijama citokina IL-1 α , TNF- α i IL-10 kod ispitanika s AB i ispitanika s MCI: no kod ispitanika s blagim kognitivnim poremećajem, pokazana je značajna korelacija samo između broja bodova na skali MMSE i dobi jer su stariji ispitanici rješavali MMSE test slabije od mlađih ispitanika. Nije bilo utjecaja spola na koncentraciju citokina; koncentracije citokina IL-1 α , TNF- α i IL-10 u serumu nisu se značajno razlikovale između muških i ženskih ispitanika s AB ili između muških i ženskih ispitanika s MCI. Koncentracije IL-1 α , TNF- α i IL-10 nisu se razlikovale između nosioca IL-10 rs1800896, IL-1 α rs1800587 i TNF- α rs1800629 genotipova. Slična raspodjela IL-1 α rs1800587, TNF- α rs1800629 i IL-10 rs1800896 genotipova kod osoba s AB i MCI nije potvrdila da su specifični genotipovi rizik za razvoj AB. Nisu utvrđene značajne razlike u rezultatima MMSE testa i Testu crtanja sata kod ispitanika s AB ili kod ispitanika s MCI podijeljenih u nosioce TC, CC i TT genotipa obzirom na polimorfizam IL-1 α rs1800587; ili podijeljenih u nosioce GG i A nosioce obzirom na TNF- α rs1800629; ili podijeljenih u nosioce AA, GG i AG genotipa obzirom na IL-10 rs1800896. Ti su rezultati potvrdili da nema značajne povezanosti između 3 različita polimorfizma za IL-10 rs1800896, IL-1 α rs1800587 i TNF- α rs1800629 i kognitivnih simptoma u ispitanika s AB i MCI. Ovo je istraživanje potvrdilo hipotezu da su promjene u koncentraciji citokina IL-1 α , TNF- α i IL-10 u serumu povezane s razvojem AB, ali da genetičke varijante IL-1 α rs1800587, TNF- α rs1800629 i IL-10 rs1800896 nisu povezane s AB, te da promjene u koncentraciji citokina IL-1 α , TNF- α i IL-10 u serumu i različite genetičke varijante varijante IL-1 α rs1800587, TNF- α rs1800629 i IL-10 rs1800896 nisu povezane s razvojem kognitivnih simptoma u AB.

9. SUMMARY

Neurobiological underpinning of AD included neuroinflammation and altered cytokine release. The aim of the study was to define the role of the cytokines IL-1 α , TNF- α and IL-10 in subjects with Alzheimer's disease (AD) and subjects with mild cognitive impairment (MCI). Our study included a total of 174 subjects, of whom 69 were men and 105 were women: 74 had AD and 100 had MCI. Significant differences in the concentration of cytokines IL-1 α , TNF- α and IL-10 were found between subjects with AD and MCI: subjects with AD had significantly higher TNF- α concentrations and significantly lower serum IL-10 and IL-1 α concentrations compared to subjects with MCI. These data partially confirmed the hypothesis of neuroinflammation as a risk for the development of AD. Concentrations of cytokines were not related to cognitive symptoms suggesting that selected cytokines were not associated with cognitive decline in AD. No significant correlation was found between age, Clock Drawing Test and MMSE test with cytokine concentrations IL-1 α , TNF- α and IL-10 in subjects with AD and subjects with MCI: but in subjects with MCI, a significant correlation was shown only between the number of MMSE scores and age, because older subjects performed poorer the MMSE than younger subjects. There was no gender influence on cytokine concentrations: serum concentrations of cytokines IL-1 α , TNF- α and IL-10 did not differ significantly between male and female subjects with AD or between male and female subjects with MCI. Concentrations of IL-1 α , TNF- α and IL-10 did not differ between carriers of the IL-10 rs1800896, IL-1 α rs1800587 and TNF- α rs1800629 genotypes. Similar distribution of the IL-1 α rs1800587, TNF- α rs1800629 and IL-10 rs1800896 genotypes in subjects with AD and MCI failed to confirm that these specific genotypes are risk genotypes for AD development. No significant differences were found in the results of the MMSE and the Clock drawing test in patients with AD or in subjects with MCI subdivided into carriers of TC, CC and TT genotype of the IL-1 α rs1800587 polymorphism; into GG and A carriers of the TNF- α rs1800629; or into carriers of AA, GG and AG genotype of the IL-10 rs1800896. These results confirmed that there was no significant association between 3 different polymorphisms for IL-10 rs1800896, IL-1 α rs1800587 and TNF- α rs1800629 and cognitive symptoms in subjects with AD and MCI. This study confirmed the hypothesis that changes in serum concentrations of cytokines IL-1 α , TNF- α and IL-10 were associated with AD development, but that genetic variants of IL-1 α rs1800587, TNF- α rs1800629 and IL-10 rs1800896 were not associated with AD, and that changes in serum cytokine concentrations of IL-1 α , TNF- α , and IL-10 and different genetic variants of IL-1 α variant rs1800587, TNF- α rs1800629, and IL-10 rs1800896 were not associated with the development of cognitive symptoms in AD.

10. POPIS KRATICA

AB	Alzheimerova bolest
ACD	Acid citrat dekstroza
AFA	Američko udruženje za AB
ANG-2	Angiopietin-2
APC	Antigen prezentirajuće stanice
APOE	Apolipoprotein E
APP	Amiloidni prekursorski protein
A β	Peptid amiloid beta
BDNF	Moždani neurotrofni čimbenik
CD33	Površinski stanični antigen
CD8+	Citotoksične T stanice
CDR	Skala za ocjenu kliničke demencije
CDT	Test crtanja sata
CR1	Komplement receptora 1
CLSI	Institut za kliničke laboratorijske standarde
CSF	Čimbenici poticanja rasta kolonija
DNA	Deoksiribonukleinska kiselina
DSM-V	Dijagnostički i statistički priručnik za mentalne poremećaje
EDTA	Etilendiamintetraoctena kiseline
EGF	Epidermalni čimbenik rasta
ELISA	Enzimsko-imunokemijski test za kvantitativno određivanje humanog antigena
EOAD	AB ranog početka
EU	Europska unija
FAD	Nasljedni oblik AB
FAM	Fluorescentna boja
FAST	Test funkcionalnog ocjenjivanja
G-CSF	Granulocitni stimulirajući čimbenik rasta kolonija

GDNF	Neurotrofni čimbenik glijalnih stanica
GM-CSF	Čimbenici poticanja granulocitnih i makrofagnih kolonija
HDL	Lipoproteini velike gustoće
HWE	Hardy-Weinbergovof ekvilibrijum
ICAM-1	Unutarstanične adhezijske molekule
IFN	Interferon
IL-10	Interleukin 10
IL-1 α	Interleukin 1 alfa
LOAD	Sporadični oblik AB
MAP	Mikrotubulima pridruženi protein
MCI	Blagi spoznajni poremećaj
MCP3	Monocitni kemotaksični protein 3
M-CSF	Čimbenik poticanja makrofagnih kolonija
MIP1 δ	Makrofagna inflamatorna bjelančevina 1 δ
MIP4	Makrofagna inflamatorna bjelančevina 4
NFQ	Utišavač fluorescencije
MMSE	Mini-mental test za otkrivanje demencija
NINCDS-ADRDA	Nacionalni institut za neurološke i komunikativne poremećaje i moždani udar koji je dio američkog Nacionalnog instituta za zdravlje
NK	NK stanice
NO	Dušikov monoksid
PCR	Lančana reakcija umnožavanja polimerazom
PDGF-BB	Čimbenici rasta trombocita
PSEN1	Presenilin 1
PSEN2	Presenilin 2
RANTES	Regulirana aktivacijom, normalna ekspresija i izlučivanje T stanica
RCLB	Otopina za lizu eritrocita
SZO	Svjetska zdravstvena organizacija

SŽS	Središnji živčani sustav
Tc	Citotoksične T stanice
TGF	Transformirajući čimbenik rasta
TNF- α	Čimbenik tumorske nekroze alfa
UN	Ujedinjeni narodi
VDA	Varghino i Delaneyvo A
VIC	Fluorescentna boja
VLDL	Lipoproteini vrlo male gustoće

11. ŽIVOTOPIS

Ime i prezime: Marija Čuljak

Datum rođenja: 13. 9. 1966.

Mjesto rođenja: Ljubuški, Bosna i Hercegovina

Adresa: Božidara Magovca 14, 10010 Zagreb

E-mail: culjakmarija@gmail.com

Adresa zaposlenja:

KBC Sestre milosrdnice

Klinički zavod za kemiju

Vinogradska 29, 10000 Zagreb

Telefon: +38513787383

Fax: +38513787280

Radno iskustvo:

1990. – (do danas) Klinički zavod za kemiju

Školovanje:

2016. upisala Sveučilišni poslijediplomski interdisciplinarni doktorski studij

Molekularnebioznanosti, Sveučilište J. J. Strossmayer u Osijeku

2012. diplomirala na Fakultetu zdravstvenih studija u Sarajevu, Univerzitet u Sarajevu

1985. završila srednjoškolsko obrazovanje, Medicinska škola „Dr Ante Jamnicki”

Mostar

1981. završila osnovno obrazovanje u Osnovnoj školi „29. oktobar” Ljubuški

Dodatni podatci:

2018. – u tijeku: član radne grupe za flebotomiju HKZR SR MLD

2014. – u tijeku: član Stručnog povjerenstva za stručna pitanja i kvalitetu HKZR SR

MLD

2014. – u tijeku: provoditelj stručnih nadzora u medicinskim laboratorijima

zdravstvenih ustanova

Posebna znanja i vještine:

poznavanje engleskog jezika

poznavanje rada na računalu

vozačka dozvola B kategorije

Knjige

1. **Čuljak M**, Bojčić A, Flebotomija, primarni uzorci u medicinskom laboratoriju, Zagreb, Medicinska naklada, 2018. (ISBN 978-953-176-832-0).

Znanstveni radovi zastupljeni u Current Contents-u:

1. **Culjak M**, Nikolac N, Simundic AM. Short-term storage stability of serum angiotensin-converting enzyme (ACE) activity, ClinChimActa 2015;446:261-262.
2. Dukic K, Zoric M, Pozaic P, Starcic J, **Culjak M**, Saracevic A, Miler M. How compliant are technicians with universal safety measures in medical laboratories in Croatia?, Biochemia Medica 2015;25839:386-392.
3. **Culjak M**, Gveric Grginic A, Simundic AM. Bacterial contamination of reusable venipuncture tourniquets in tertiary-care hospital. Clin Chem Lab Med. 2018;56(8):e201-e203.
4. **Culjak M**, Nikolac Perkovic M, Uzun S, et al. The association between TNF-alpha, IL-1 alpha and IL-10 with Alzheimer's disease. Curr Alzheimer Res. 2020, prihvaćen za tisak.

Znanstveni radovi u drugim časopisima:

1. **Čuljak, Marija** "Hemochromatosis Treatment by Venipuncture Through History". Southeastern European Medical Journal, vol. 2, br. 1, 2018, str. 44-48.

Kongresi i stručni skupovi:

1. **Čuljak M**, Biokemijski pokazatelji alkoholne ovisnosti II Kongres 32 oktobrinski sredbi so međunarodno učestvo, 5. – 9. 10. 2004, Ohrid (predavanje, sažetak).
2. Halilović E, Getaldić Švarc B, **Čuljak M**, Božić N, Vrkić N. Evaluacija metode za određivanje retikularnih trombocita na Abbott cd sapphire, 1. Kongres hrvatske komore zdravstvenih radnika, 2012. (poster, sažetak).
3. Vukasović I, **Čuljak M**, Vrkić N, Saračević A, Vuga I. Upravljanje dislociranim laboratorijima. Odgovornost za radno ozračje, Simpozij LOKUS, Laboratorij – Organizacija – Kvaliteta – Upravljanje – Sustav (poster, sažetak).

4. Čelap I, Nikolac N, **Čuljak M**, Šimundić AM. Primjena CLSI smjernica za uzorkovanje venske krvi, Simpozij LOKUS, Laboratorij – Organizacija – Kvaliteta – Upravljanje – Sustav. (poster, sažetak).
5. **Čuljak M**, Halilović E, Gržan K, Šimundić AM. Točnost genotipizacije I/D polimorfizma ace gena, 2. Kongres, Hrvatske udruge laboratorijske medicine, Knjiga sažetaka (Matić J. ur), 22. – 25. travnja 2009, Mali Lošinj (poster).
6. **Čuljak M**, Halilović E, Božić N, Vrkić N. Laboratorijski pokazatelji terapijskog učinka eritropoetina kod anemije kronične bubrežne bolesti, 1. Kongres Hrvatske komore zdravstvenih radnika, Knjiga sažetaka (Matić J. ur) 18.–21. travnja 2012., Baška (poster). <http://mld.com.hr/wp-content/uploads/2019/01/Knjiga-sažetaka-1.-Kongres-SR-MLD.pdf>.
7. **Čuljak M**, Nikolac N, Šimundić AM Stabilnost angiotenzin-konvertirajućeg enzima (ace) kao analita, 2. Kongres hrvatske komore zdravstvenih radnika – strukovnog razreda za medicinsko laboratorijsku djelatnost, Knjiga sažetaka (Caban D. ur) 29. 5. – 1. 6. 2014., Zagreb (predavanje, sažetak) <http://mld.com.hr/wp-content/uploads/2018/03/Knjiga-sažetaka-2.-kongres-HKZR-SR-MLD.pdf>.
8. **Čuljak M**, Stručni nadzor u medicinsko-dijagnostičkom laboratoriju, 2. Kongres hrvatske komore zdravstvenih radnika – strukovnog razreda za medicinsko laboratorijsku djelatnost, Knjiga sažetaka (Caban D. ur) 29.5.–1.6.2014., Zagreb (predavanje, sažetak). <http://mld.com.hr/wp-content/uploads/2018/03/Knjiga-sažetaka-2.-kongres-HKZR-SR-MLD.pdf>.
9. Begović M, **Čuljak M**, Poznavanje predanalitike u studijskom programu Zdravstvenog veleučilišta, Zagreb, 3. Kongres hrvatske komore zdravstvenih radnika – strukovnog razreda za medicinsko laboratorijsku djelatnost, Knjiga sažetaka, (Caban. D. ur.) 5. 6. 2016, Opatija (poster, sažetak.). <http://mld.com.hr/wp-content/uploads/2018/03/Knjiga-sažetaka-2.pdf>.
10. **Čuljak M**, Istraživanje mikroflore podveza koje se koriste pri uzorkovanju venske krvi 3. Kongres hrvatske komore zdravstvenih radnika – strukovnog razreda za medicinsko-laboratorijsku djelatnost, Knjiga sažetaka (Caban D. ur.), 2.6.–5.6.2016, Opatija (predavanje, sažetak). <http://mld.com.hr/wp-content/uploads/2018/03/Knjiga-sažetaka-2.pdf>.
11. **Čuljak M**, Važnost medicinsko-laboratorijske djelatnosti u predanalitičkoj fazi laboratorijskog procesa,, Knjiga sažetaka (Hančić. S.,ur.),4. Kongres hrvatske komore zdravstvenih radnika – strukovnog razreda za medicinsko-laboratorijsku djelatnost, 6. –

9. 6. 2018, Zagreb (predavanje, sažetak). http://mld.com.hr/wp-content/uploads/2019/01/Knjiga-sažetaka_4.-Kongres-HKZR-SR-MLD-22.1.2019.pdf.
12. Konferencija Point of care testing: The Patient is the point, 8. listopada 2015, Zagreb.
13. EFLM-BD European Conference on Preanalytical Phase, 1. – 2. ožujka 2013., Zagreb.
14. Ljudevit Jurak, International Symposium on Comparative Pathology June 12, 2015, Zagreb.
15. **Čuljak M**, Theoretical and practical knowledge of pre-analytical phase and blood sampling among students of medical laboratory diagnostics, 5th EFLM Conference on Preanalytical Phase, 22.–23. ožujka 2019, Zagreb (poster).