

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Sveučilište u Dubrovniku
Institut Ruđer Bošković u Zagrebu
Sveučilišni poslijediplomski interdisciplinarni doktorski studij
Molekularne bioznanosti

Matea Nikolac Perković

ULOGA MOŽDANOG NEUROTROFNOG ČIMBENIKA U DEMENCIJI

DOKTORSKA DISERTACIJA

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

Osijek, 2015.

Doktorska disertacija izrađena je u Laboratoriju za molekularnu neuropsihijatriju Instituta „Ruđer Bošković“ u Zagrebu, pod vodstvom prof. dr.sc. Nele Pivac, znanstvene savjetnice, u sklopu Sveučilišnog poslijediplomskog interdisciplinarnog doktorskog studija Molekularne bioznanosti u Osijeku.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Sveučilište u Dubrovniku
Institut Ruđer Bošković
Sveučilišni poslijediplomski interdisciplinarni
doktorski studij Molekularne bioznanosti

Doktorski rad

Znanstveno područje: Biomedicina i zdravstvo
Znanstveno polje: Temeljne medicinske znanosti

ULOGA MOŽDANOG NEUROTROFNOG ČIMBENIKA U DEMENCIJI

Matea Nikolac Perković

Rad je izrađen u: Laboratoriju za molekularnu neuropsihijatriju Zavoda za molekularnu medicinu Instituta „Ruđer Bošković“, Bijenička cesta 54, 10000 Zagreb

Mentor: prof. dr.sc. Nela Pivac, znanstveni savjetnik

Kratki sažetak doktorskog rada:

Demencija je sindrom globalnog i progresivnog oštećenja stečenih kognitivnih sposobnosti koji rezultira otežanim obavljanjem svakodnevnih aktivnosti i koji je često popraćen i dodatnim neurološkim ili psihijatrijskim simptomima. Ovo istraživanje daje bolji uvid u ulogu moždanog neurotrofnog čimbenika u demenciji, točnije u ulogu ovog neurotrofina u razvoju kognitivnih te bihevioralnih i psiholoških simptoma demencije, sa svrhom da ponudi nove lako dostupne biokemijske i genetičke pokazatelje spomenutih simptoma demencije i dodatno doprinese novim spoznajama u razumijevanju i liječenju tih simptoma.

Broj stranica: 217

Broj slika: 35

Broj tablica: 54

Broj literaturnih navoda: 467

Jezik izvornika: Hrvatski

Ključne riječi: demencija, Alzheimerova bolest, moždani neurotrofni čimbenik, kognitivni simptomi, bihevioralni simptomi, psihološki simptomi, biomarker

Datum obrane: 21. svibnja 2015.

Stručno povjerenstvo za obranu:

1. Prof. dr. sc. Đurđica Ugarković, znanstvena savjetnica (predsjednica povjerenstva)
2. Prof. dr. sc. Nela Pivac, znanstvena savjetnica (mentor i član)
3. Prof. dr. sc. Fran Borovečki, dr. med., izvanredni profesor (član)
4. Dr. sc. Dubravka Švob Štrac, znanstvena suradnica (zamjena člana)

Rad je pohranjen u: Gradskoj i sveučilišnoj knjižnici Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Sveučilištu Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Trg sv. Trojstva 3, Osijek

BASIC DOCUMENTATION CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
University of Dubrovnik
Ruđer Bošković Institute
University Postgraduate Interdisciplinary Doctoral Study of
Molecular biosciences

PhD thesis

Scientific Area: Biomedicine and health

Scientific Field: Basic Medical Sciences

THE ROLE OF BRAIN DERIVED NEUROTROPHIC FACTOR IN DEMENTIA

Matea Nikolac Perković

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

Supervisor: prof. Nela Pivac, PhD, senior scientist

Short abstract:

Dementia is a syndrome of global and progressive impairment of cognitive abilities which makes it difficult to perform normal daily activities, and is often accompanied by additional neurological or psychiatric symptoms. This research provides a better insight into the role of brain-derived neurotrophic factor in dementia, particularly its role in the development of cognitive, behavioral and psychological symptoms of dementia. The main purpose of this study is to offer new, easily accessible, biochemical and genetic indicators of various symptoms of dementia and provide new insights that will help us to better understand and effectively treat these symptoms.

Number of pages: 218

Number of figures: 35

Number of tables: 54

Number of references: 467

Original in: Croatian

Key words: dementia, Alzheimer's disease, brain-derived neurotrophic factor, cognitive symptoms, behavioral symptoms, psychological symptoms, biomarker

Date of the thesis defense: 21st May 2015

Reviewers:

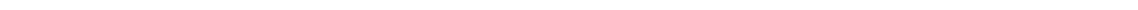
1. Prof. Đurđica Ugarković, PhD, senior scientist (president of review committee)
2. Prof. Nela Pivac, PhD, senior scientist (supervisor and reviewer)
3. Prof. Fran Borovečki, MD, PhD, assistant professor (reviewer)
4. Dubravka Švob Štrac, PhD, research associate (substitute reviewer)

Thesis deposited in: City and University Library of Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Trg sv. Trojstva 3, Osijek



Mojoj mami...

Ti si ljubav i snaga koje vječno nosim u srcu.



Zahvale

Veliko hvala mojoj mentorici, prof. dr. sc. Neli Pivac, znanstvenoj savjetnici, na stručnom vodstvu, korisnim savjetima te nesebičnoj podršci i razumijevanju tijekom izrade doktorskog rada. Hvala na prenesenom bogatom znanju i iskustvu koje mi je dalo izvrsne temelje za daljnji znanstveno-istraživački rad.

Na velikom strpljenju, suradnji, konkretnim komentarima i savjetima te ugodnoj radnoj atmosferi, zahvaljujem svim sadašnjim, bivšim i budućim članovima Laboratorija za molekularnu neuropsihijatriju Instituta “Ruđer Bošković”; dr. sc. Dorotei Mück-Šeler, znanstvenoj savjetnici, te dragim suradnicama i prijateljicama; dr. sc. Gordani Nedić Erjavec, dr. sc. Maji Mustapić, dr. sc. Dubravki Švob-Štrac te gđi. Snježani Juler.

Također zahvaljujem prof. dr. sc. Franu Borovečkom i ostalim članovima Odjela za funkcionalnu genomiku Medicinskog fakulteta u Zagrebu, posebno dr. sc. Kristini Gotovac i Filpu Josipu Binguli, na velikodušnoj pomoći te na izrazito ugodnoj suradnji.

Zahvalu dugujem i prof. dr. sc. Đurđici Ugarković što je bez ustručavanja pristala biti predsjednica povjerenstva za obranu ovog doktorata.

Hvala svim članovima Zavoda za molekularnu medicinu Instituta “Ruđer Bošković” na podršci, pomoći i korisnim savjetima.

Cijeloj mojoj obitelji, posebice roditeljima i sestri Marini, od sveg srca zahvaljujem na beskrajnoj i bezuvjetnoj podršci, strpljenju, ljubavi i povjerenju koje su imali u mene tijekom cijelog mog obrazovnog puta, od prvoškolskih klupa do danas.

Hvala mom suprugu Luki što je uvijek bio uz mene i pružao mi bezgranično razumijevanje, ljubav, potporu, pomoć, čak i u onim najtežim trenucima.

Mojim najdražim malcima, Filipu Janu i Toniju, hvala što su mi u život unijeli više ljubavi i smijeha nego što sam mislila da je moguće te mi tako uljepšali i olakšali put prema cilju.

Na kraju, veliko hvala svim mojim dragim prijateljima koji su bili bezuvjetno uz mene kao čvrsti oslonac i podrška.

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1. Demencija	2
1.1.1. Klasifikacija demencija	3
1.1.2. Dijagnoza demencije	4
1.1.3. Farmakološka terapije demencije	7
1.2. Bihevioralni i psihološki simptomi demencije (BPSD)	9
1.2.1. Liječenje bihevioralnih i psiholoških simptoma u demenciji	9
1.2.2. Genetičke studije vezane za razvoj bihevioralnih i psiholoških simptoma u demenciji	10
1.3. Tipovi demencije	12
1.3.1. Alzheimerova bolest	12
1.3.2. Vaskularna demencija	20
1.3.3. Frontotemporalna demencija	21
1.3.4. Bolest Lewyjevih tjelešaca	22
1.4. Biomarkeri u dijagnozi demencije	24
1.4.1. Biomarkeri u cerebrospinalnoj tekućini (likvoru)	24
1.4.2. Biomarkeri u plazmi	26
1.5. Blagi kognitivni (spoznajni) poremećaj	27
1.6. Moždani neurotrofni čimbenik	29
1.6.1. Sinteza, otpuštanje i signalni putevi moždanog neurotrofnog čimbenika	31
1.6.2. Uloga moždanog neurotrofnog čimbenika u učenju i pamćenju	34
1.6.3. Moždani neurotrofni čimbenik u Alzheimerovoj bolesti	35
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	42
3. MATERIJALI I METODE	44
3.1. Ispitanici	45
3.1.1. Klinička obrada ispitanika	45
3.1.2. Psihometrijski testovi u dijagnozi demencije	46
3.1.3. Etički aspekt istraživanja	50
3.2. Obrada uzoraka krvi	51
3.2.1. Postupak izdvajanja plazme siromašne trombocitima iz uzoraka pune krvi	51
3.2.2. Postupak izolacije mononuklearnih stanica periferne krvi	52
3.3. Izdvajanje genomske DNA iz krvi	53
3.4. Genotipizacija polimorfizama gena za moždani neurotrofni čimbenik i tropomiozin-receptor-kinazu B	55
3.5. Određivanje koncentracije moždanog neurotrofnog čimbenika u plazmi	60

Sadržaj

3.6.	Određivanje ukupne koncentracije proteina u plazmi _____	63
3.7.	Izdvajanje RNA iz mononuklearnih stanica periferne krvi _____	65
3.8.	Reverzna transkripcija izolirane mRNA u komplementarnu DNA _____	68
3.9.	Određivanje ekspresije gena za moždani neurotrofni čimbenik i sortirajući receptor prekursora peptida amiloid- β _____	70
3.10.	Statistička obrada podataka _____	73
4.	REZULTATI _____	75
4.1.	Demografski podaci _____	76
4.2.	Koncentracija moždanog neurotrofnog čimbenika u plazmi _____	79
4.2.1.	Demografske varijable (dob, spol, obrazovanje) i koncentracija moždanog neurotrofnog čimbenika u plazmi _____	79
4.2.2.	Koncentracija moždanog neurotrofnog čimbenika u plazmi ispitanika oboljelih od demencije ili blagog kognitivnog (spoznajnog) poremećaja _____	81
4.2.3.	Koncentracija moždanog neurotrofnog čimbenika u plazmi i kognitivni simptomi demencije _____	83
4.2.4.	Koncentracija moždanog neurotrofnog čimbenika u plazmi te bihevioralni i psihološki simptomi demencije _____	97
4.3.	Polimorfizmi gena za moždani neurotrofni čimbenik i tropomiozin-receptor-kinazu B _____	100
4.3.1.	Polimorfizmi gena za moždani neurotrofni čimbenik i tropomiozin-receptor-kinazu B kod oboljelih od demencije ili blagog kognitivnog (spoznajnog) poremećaja _____	101
4.3.2.	Polimorfizmi gena za moždani neurotrofni čimbenik i tropomiozin-receptor-kinazu B u kognitivnim simptomima demencije _____	103
4.3.3.	Polimorfizmi gena za moždani neurotrofni čimbenik i tropomiozin-receptor-kinazu B u bihevioralnim i psihološkim simptomima demencije _____	113
4.4.	Neravnoteža udruživanja alela i haplotipovi gena za moždani neurotrofni čimbenik _____	121
4.4.1.	Haplotipovi gena za moždani neurotrofni čimbenik kod oboljelih od demencije ili blagog kognitivnog (spoznajnog) poremećaja _____	123
4.4.2.	Haplotipovi gena za moždani neurotrofni čimbenik i kognitivni simptomi demencije _____	125
4.4.3.	Haplotipovi gena za moždani neurotrofni čimbenik te bihevioralni i psihološki simptomi demencije _____	128
4.5.	Polimorfizmi gena za moždani neurotrofni čimbenik te tropomiozin-receptor-kinazu B i koncentracija moždanog neurotrofnog čimbenika u plazmi _____	136
4.6.	Ekspresija gena za moždani neurotrofni čimbenik i sortirajući receptor prekursora peptida amiloid-β _____	137

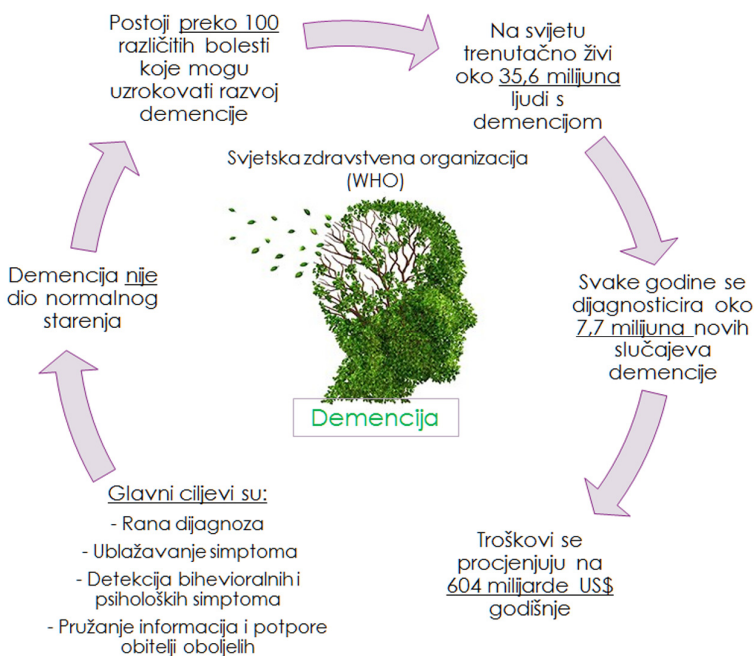
Sadržaj

5. RASPRAVA	139
5.1. Demografski podaci	141
5.2. Koncentracija moždanog neurotrofnog čimbenika u plazmi	142
5.2.1. Koncentracija moždanog neurotrofnog čimbenika u plazmi ispitanika oboljelih od demencije ili blagog kognitivnog (spoznajnog) poremećaja	143
5.2.2. Koncentracija moždanog neurotrofnog čimbenika u plazmi i kognitivni simptomi demencije	145
5.2.3. Koncentracija moždanog neurotrofnog čimbenika u plazmi te bihevioralni i psihološki simptomi demencije	147
5.3. Polimorfizmi gena za moždani neurotrofni čimbenik i tropomiozin-receptor-kinazu B	151
5.3.1. Polimorfizmi gena za moždani neurotrofni čimbenik i tropomiozin-receptor-kinazu B kod oboljelih od demencije ili blagog kognitivnog (spoznajnog) poremećaja	152
5.3.2. Polimorfizmi gena za moždani neurotrofni čimbenik i tropomiozin-receptor-kinazu B u kognitivnim simptomima demencije	154
5.3.3. Polimorfizmi gena za moždani neurotrofni čimbenik i tropomiozin-receptor-kinazu B u bihevioralnim i psihološkim simptomima demencije	158
5.4. Polimorfizmi gena za moždani neurotrofni čimbenik te tropomiozin-receptor-kinazu B i koncentracija moždanog neurotrofnog čimbenika u plazmi	161
5.5. Ekspresija gena za moždani neurotrofni čimbenik i sortirajući receptor prekursora peptida amiloid- β	162
6. ZAKLJUČCI	165
LITERATURA	168
SAŽETAK	198
SUMMARY	200
POPIS KRATICA	202
ŽIVOTOPIS	206

1. UVOD

1.1. Demencija

Demencija (lat. *de* – bez, *mens* – um) je sindrom globalnog i progresivnog oštećenja stečenih kognitivnih sposobnosti pri očuvanoj svijesti, prouzročen organskom bolešću središnjeg živčanog sustava (SŽS), u kojem su posebno oštećene sposobnosti pamćenja, učenja, apstraktnog mišljenja, orijentacije te poimanja vidno-prostornih odnosa. Demenciju se ne može promatrati kao jedinstvenu dijagnozu, već kao skup simptoma koji rezultiraju nemogućnošću obavljanja osnovnih društvenih, moralnih te radnih obaveza.



Slika 1. Činjenice o demenciji koje ističe Svjetska zdravstvena organizacija.

Izvor: <http://www.who.int/features/factfiles/dementia/en/>

Prevalencija demencije u Europi kreće se u rasponu od 6 do 18% kod osoba starijih od 65 godina, a kod osoba starijih od 85 godina ona čak doseže 30% (prema nekim podacima i 50%) (Prince i sur., 2013). U Republici Hrvatskoj ne postoji službeni registar oboljelih od demencije, ali smatra se da, uzevši u obzir podatke za ostatak Europe i broj stanovnika Hrvatske starijih od 65 godina, u našoj zemlji danas od demencije boluje od 50 000 do 80 000 ljudi. Ako se uzme u obzir činjenica da je stanovništvo sve starije, tj. da se prosječna životna dob stanovništva stalno produžuje, za očekivati je da će u vrlo skoroj budućnosti demencija postati jedan od vodećih medicinskih, društvenih, ali i ekonomskih problema modernog društva. Svjetska zdravstvena organizacija (WHO, engl. *World Health Organisation*) procjenjuje da trenutno na svijetu od demencije boluje oko 35,6 milijuna ljudi (Slika 1), a pretpostavka je da će se taj broj udvostručiti do 2030. godine, tj. utrostručiti do 2050. godine (WHO, 2010).

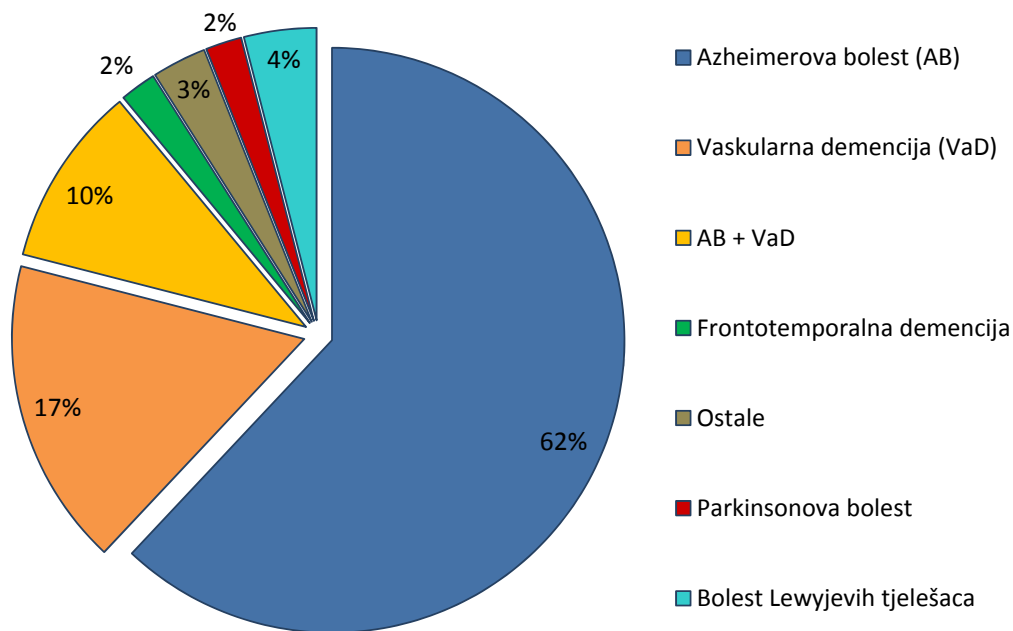
1.1.1. Klasifikacija demencija

Demencije se danas često dijele na: kortikalne, subkortikalne, progresivne, primarne i sekundarne demencije. Postoje naravno oblici demencije, kao što je Alzheimerova bolest (AB), koje se mogu svrstati u više navedenih kategorija (AB se svrstava u kortikalne, progresivne i primarne demencije).

Podjela na kortikalne i subkortikalne demencije temelji se na aspektu kliničke slike. Kortikalne su demencije u početnim fazama bolesti karakterizirane promjenama kognitivnih funkcija koje uključuju oštećenje kratkotrajnog pamćenja ili promjene u ponašanju i osobnosti bolesnika. U početnim fazama subkortikalne demencije izraženi su simptomi usporavanja mentalnog procesa, promjena raspoloženja, izostanak motivacije i inicijacije, ali su nedostaci kognitivnih funkcija manje izraženi. U kortikalne demencije se, između ostalog, ubrajaju i AB te Creutzfeldt-Jakobova bolest, dok je najčešći tip subkortikalne demencije Parkinsonova bolest (PB). Progresivne demencije su one čiji simptomi s vremenom postaju sve izraženiji, a u njih ubrajamo AB, vaskularnu demenciju (VaD), frontotemporalnu demenciju (FTD) te bolest Lewyjevih tjelešaca (DLB, engl. *Dementia with Lewy Bodies*). Podjela na primarne i sekundarne demencije odnosi se na sam uzrok bolesti. Primarne demencije su posljedica direktnog oštećenja moždanog tkiva dok su sekundarne demencije posljedica nekih drugih stanja kao što su:

- metabolički i endokrinološki poremećaji (dijabetička ketoacidoza, hipoglikemija, hipotiroidizam, hipo- i hiperparatiroidizam, Addisonova bolest, Cushingov sindrom),
- infekcije (meningitis, encefalitis, infekcija virusom humane imunodeficijencije),
- uzimanje određenih lijekova (antiepileptici, antihistaminici, tablete za spavanje, triciklički antidepressivi, tablete za spavanje),
- kronična zlouporaba alkohola i/ili droga,
- tumor na mozgu,
- nedostatka vitamina (vitamini E i B skupine; B1, B3, B6, B9 i B12).

Za razliku od primarnih demencija, sekundarne demencije nisu progresivne i mogu biti reverzibilne. Najčešći oblik demencije je sigurno AB, a slijede ju duge primarne demencije kao što su VaD, FTD i DLB (Slika 2).



Slika 2. Učestalost pojedinih tipova demencije u svjetskoj populaciji.

1.1.2. Dijagnoza demencije

Demencija je karakterizirana pojavom kognitivnih smetnji i otežanog obavljanja svakodnevnih aktivnosti, ali je ona često popraćena i dodatnim neurološkim ili psihijatrijskim simptomima. Za dijagnozu demencije danas se koriste:

- kombinacije laboratorijskih pretraga i neurološkog pregleda kako bi se isključili svi ostali potencijalni uzroci demencije,
- kombinacije metoda radiološke dijagnostike kao što su računalna tomografija (CT, engl. *Computed Tomography*) i magnetska rezonancija (MRI, engl. *Magnetic Resonance Imaging*), kako bi se detektirala atrofija entorinalnog korteksa ili hipokampusu,
- kombinacije radionukleidnih metoda kao što su pozitronska emisijska tomografija (PET, engl. *Positron Emission Tomography*) i jedno-fotonska emisijska računalna tomografija (SPECT, engl. *Single-Photon Emission Computed Tomography*), kako bi se mogla pratiti snižena perfuzija ili snižena metabolička aktivnost u pojedinim moždanim regijama.

Za procjenu kognitivnog oštećenja koriste se različiti orijentacijski testovi koji moraju uključivati procjenu pažnje, orijentacije, dugoročne i kratkoročne memorije, govora, prakse, vizualno-prostornih sposobnosti, mogućnost donošenja odluke, itd.

Uz navedene metode koriste se i metode neuropsihologijske dijagnostike, tj. psihometrijski testovi koji su posebno dizajnirani za bolesnike s demencijom jer demenciju često prate i drugi psihijatrijski simptomi (depresija, anksioznost, euforija, apatija, psihotični simptomi i dr.).

1.1.2.1. Kriteriji za dijagnozu demencije

Za dijagnozu AB-a koriste se općeprihvaćeni kriteriji prema:

- Nacionalnom institutu za neurološke i komunikacijske poremećaje te moždani udar - Asocijacija za Alzheimerovu bolest i srodne poremećaje (NINCDS-ADRDA, engl. *National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke – the Alzheimer's Disease and Related Disorders Association*) (Jack i sur., 2011; McKhann i sur., 1984),
- Međunarodnoj klasifikaciji bolesti, 10. revizija (MKB-10, engl. *International Classification of Diseases and Related Health Problems - ICD-10*) (WHO, 2010),
- Dijagnostičkom i statističkom priručniku mentalnih poremećaja, 4. izdanje (DSM-IV, engl. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, fourth edition*) (APA, 2000).

Prema MKB-10 demencija se definira kao deterioracija pamćenja (upamćivanja, zadržavanja i reprodukcije upamćenog) i mišljenja, u tolikoj mjeri da oštećuje socijalno funkcioniranje. MKB-10 kriteriji rijetko se koriste u istraživačke svrhe. Ovi kriteriji svrstavaju demencije u skupinu organskih i simptomatskih mentalnih poremećaja koji se svi nalaze pod šiframa F00 do F09, a ubrajaju: demenciju u AB-u (F00), VaD (F01), demenciju u drugim bolestima (F02: demencija u Pickovoj bolesti, Creutzfeldt-Jakobovoj bolesti, Huntingtonovoj bolesti, PB-u, u bolesti AIDS-a i drugim označenim bolestima) te nespecifične demencije (F03).

Prema kriterijima DSM-IV demencija se odnosi na razvitak višestrukih kognitivnih nedostataka uz prisutan barem još jedan od navedenih poremećaja: afaziju, apraksiju, agnoziju i/ili poremećaj u izvršnom funkcioniranju. Također, DSM-IV kriteriji navode da kognitivne smetnje moraju biti takve da uzrokuju poremećaj normalnog djelovanja osobe na radnom mjestu i u društvu. DSM-IV kriteriji dodatno klasificiraju AB u dva podtipa: AB s ranim (do 65 godina starosti) i AB s kasnim početkom (nakon 65 godina starosti), a ove dvije skupine se dalje dijele s obzirom na prisutnost delirija, deluzija ili depresije.

U istraživačke svrhe najčešće se koriste kriteriji prema konceptu NINCDS-ADRDA koji se temelji na:

- demenciji ustanovljenoj kliničkim ispitivanjem, dokumentiranoj testom procjene mentalnog stanja (MMSE, engl. *Mini Mental State Examination*) ili nekim sličnim testom, i potvrđenoj neuropsihološkim testiranjem,
- deficitima u dva ili više kognitivnih područja,
- progresivnom slabljenju pamćenja i odsutnosti sistemskih poremećaja ili drugih bolesti koje zahvaćaju mozak.

Ovakav koncept omogućuje i kategorizaciju vjerojatnosti točnosti postavljanja dijagnoze u 3 stupnja:

- I. skoro sigurna dijagnoza koja je potvrđena histopatološkom analizom;
- II. vjerojatna dijagnoza koja je utvrđena neuropsihološkim i kliničkim pregledom, ali bez histopatološke potvrde (ova kategorija zahtijeva podmucao početak bolesti i progresivno opadanje sposobnosti pamćenja uz prisutnost barem još jedne kognitivne domene koja se utvrđuje kliničkim pregledom i potvrđuje neuropsihološkim testovima, a pacijent mora imati očuvanu razinu svijesti te moraju biti isključeni svi drugi uzroci koji bi mogli objasniti simptome).
- III. moguća dijagnoza (atipična klinička slika demencije s nepoznatom etiologijom i bez histopatološke potvrde).

Kriteriji se razlikuju u tome što NINCDS-ADRDA i MKB-10 isključuju dijagnozu AB-a u prisutnosti fokalnih neuroloških znakova, a DSM-IV isključuje dijagnozu AB-a ako su prisutne depresija i shizofrenija. Poznato je da DSM-IV ima bolju specifičnost, dok NINCDS-ADRDA pokazuje veću osjetljivost, ali manju specifičnost.

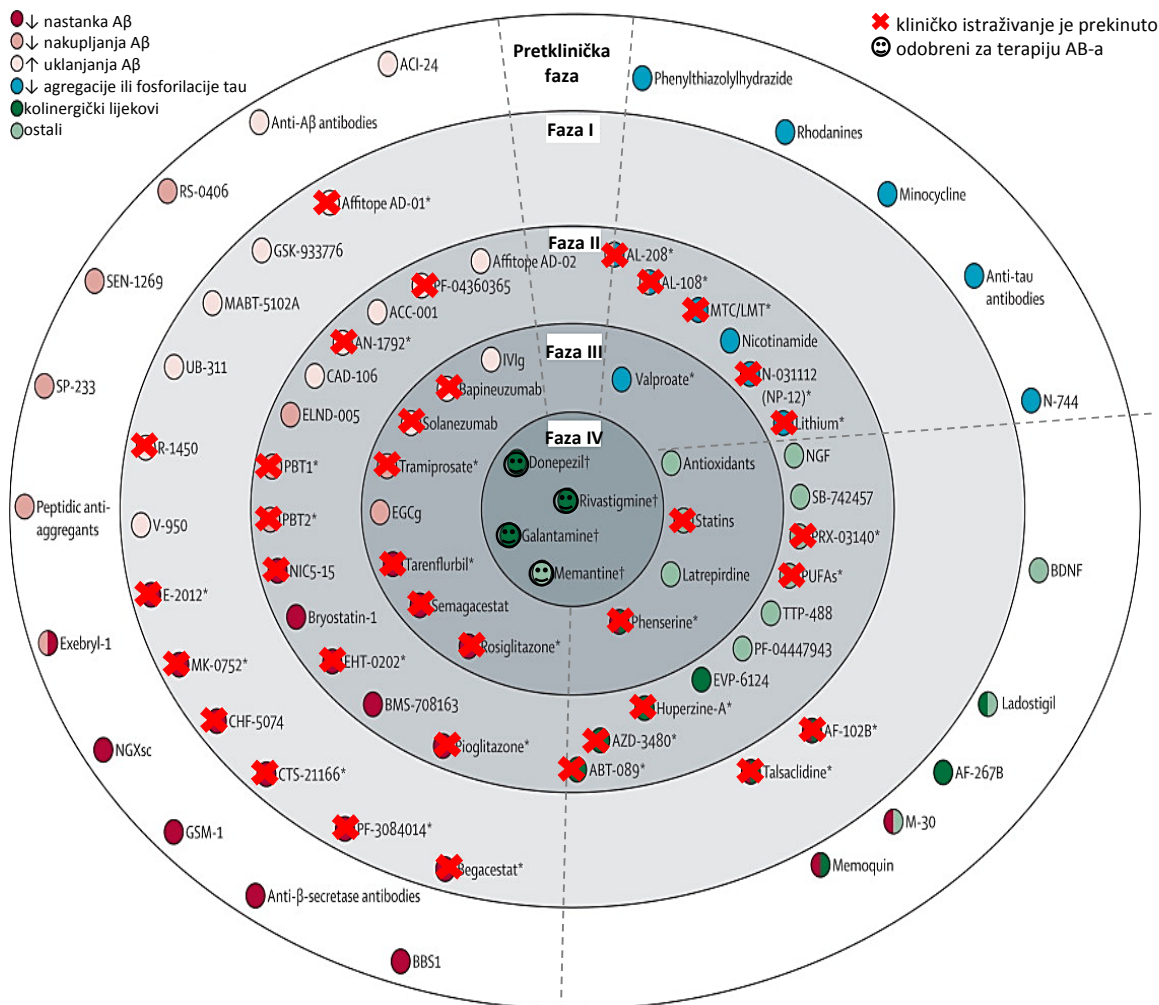
Svi kriteriji uključuju prisutnost sljedećih simptoma:

- gubitak pamćenja (osobito za nedavne događaje),
- teškoće u učenju i zadržavanju novih informacija,
- teškoće u vremenskoj i prostornoj orijentaciji,
- teškoće u izvršavanju složenijih zadataka,
- poremećaj sposobnosti prosuđivanja,
- poremećaj u vizualno-perceptivnoj orijentaciji,
- poremećaj govora i poremećaj ponašanja.

Svi kriteriji također podrazumijevaju da su svi drugi potencijalni uzroci demencije isključeni, da bolest ima postupan i progresivan tijek te da kognitivna oštećenja nisu prisutna samo za vrijeme trajanja delirija već i u njegovoj odsutnosti.

1.1.3. Farmakološka terapije demencije

Trenutna terapija demencije se svodi na tzv. simptomatsko liječenje kojim se manje ili više uspješno pokušavaju ublažiti pojedini simptomi bolesti.



Slika 3. Razvoj novih lijekova za terapiju Alzheimerove bolesti.

Preuzeto i prilagođeno iz: Mangialasche i sur. (2010).

Farmakološka terapija demencije uključuje korištenje inhibitora acetilkolinesteraze (npr. donepezil, rivastigmin, galantamin), za liječenje blagog i umjerenog oblika AB-a, te antagoniste N-metil-D-aspartat (NMDA) receptora i memantina za liječenje blagog i teškog oblika AB-a (Klafki i sur., 2006; Mangialasche i sur., 2010). Ovi lijekovi ublažavaju jednim dijelom simptome bolesti i pružaju kratkoročno poboljšanje, ali ne djeluju na same patološke mehanizme bolesti (McKhann i sur., 1984).

Osim farmakoterapije kognitivnih simptoma, liječenje demencije obuhvaća i ublažavanje simptoma poremećaja ponašanja, psihijatrijskih simptoma (depresija, anksioznost, halucinacije, manije, itd.), simptoma nesanice i nevoljnog poremećaja iskazivanja emocija. Zbog ovoga se često u terapiji demencije s klasičnim protudementnim lijekovima kombiniraju i sedativi, antipsihotici, antidepresivi, anksiolitici i ostali lijekovi.

Današnja istraživanja novih lijekova za terapiju demencije sve su više fokusirana na nove skupine lijekova kojima bi se, ne samo ublažavali simptomi, već i modificirali patološki procesi bolesti (Mangialasche i sur., 2010). Veliki dio lijekova koji se danas istražuju su lijekovi s potencijalnim učinkom na patofiziologiju amiloida ili proteina tau te lijekovi sa specifičnim djelovanjem na neurotransmitterske sustave (agonisti nikotinskih, serotonininskih i histamin 3-receptora, inhibitori fosfodiesteraze 4, modulatori receptora gama-aminomaslačne kiseline (GABA), inhibitori monoaminooksidaze B i glutaminički metabotropnih receptora skupine 2 i dr.) (Slika 3).

1.2. Bihevioralni i psihološki simptomi demencije (BPSD)

Bihevioralni i psihološki simptomi demencije (BPSD, engl. *Behavioral and Psychological Symptoms of Dementia*) često su prisutni kod osoba oboljelih od demencija te predstavljaju sastavni dio demencije. Ovi simptomi su prisutni kod oko 60-98% bolesnika, a mogu se pojaviti u bilo kojoj fazi bolesti (Hart i sur., 2003). BPSD obuhvaća nekognitivne simptome demencije među kojima dominiraju poremećaji raspoloženja, apatija ili depresija, poremećaji percepcije i mišljenja, psihotični poremećaji, agitacija te razne vrste agresivnog ponašanja.

BPSD može se dodatno podijeliti na dvije podskupine simptoma, bihevioralne i psihološke simptome. Bihevioralni simptomi najčešće uključuju fizičku agresiju, nemir, agitaciju, društveno i kulturološki neprihvatljivo i neprikladno ponašanje, seksualnu disinhibiciju, psovanje, skupljanje nepotrebnih stvari, itd. Psihološki simptomi odnose se na anksioznost, depresivno raspoloženje, halucinacije te deluzije (sumanutosti). Psihotične epizode kod pacijenata s demencijom obilježavaju deluzije, halucinacije, paranoidne i sumahnite ideje. Prisustvo BPSD-a često se povezuje s lošijom kliničkom slikom pacijenta. U prisustvu BPSD-a dolazi do puno bržeg narušavanja kognitivnih sposobnosti kod pojedinaca te značajno većih problema u obavljanju svakodnevnih obaveza. Ovi simptomi su također uzrok i veće stope smrtnosti kod oboljelih te ranije institucionalizacije.

Dijagnoza BPSD-a je složena zbog raznolikosti simptoma, a uključuje detaljnu dijagnostičku obradu, uzimanje u obzir same etiologije demencije te isključivanje svih ostalih potencijalnih uzroka komorbidnih stanja (Zaudig, 2000). Danas postoji preko 30 različitih skala kojima se mogu procjenjivati bihevioralni i psihološki simptomi kod bolesnika s demencijom. Najčešće korištene skale su neuropsihijatrijski inventar (NPI, engl. *Neuropsychiatric Inventory*), skala za procjenu bihevioralne patologije u Alzheimerovoj bolesti (BEHAVE-AD, engl. *Behavioral Pathology in Alzheimer's Disease Rating Scale*) i Cohen-Mansfield agitacijski inventar (CMAI, engl. *Cohen-Mansfield Agitation Inventory*), zbog svoje specifičnosti, pouzdanosti te nepobitnosti u dijagnozi BPSD-a (De Deyn i Wirshing, 2001; Zaudig, 2000).

1.2.1. Liječenje bihevioralnih i psiholoških simptoma u demenciji

Kvalitetan terapijski plan za pristup pacijentima s BPSD-om obuhvaća kombinaciju nadzora, bihevioralno-socijalnih i farmakoloških metoda liječenja. Prvi izbor terapije su uvijek nefarmakološke metode koje obuhvaćaju psihosocijalne intervencije, tj. skrb, nadzor i edukacijske programe za same bolesnike, ali i za njihove obitelji i skrbnike. U ovakvom obliku terapije vrlo je važan individualni pristup bolesniku koji mora uzimati u obzir fizičko stanje, tjelesne bolesti te psihičke simptome kod oboljelih, ali i čimbenike okoliša (Kozman i sur., 2006). Do sada su se uspješnima pokazale terapija glazbom, terapija svjetlom, aromaterapija te terapija koristeći kućne ljubimce (Hersch i Falzgraf, 2007).

U težim slučajevima BPSD-a, jedini pristup je farmakoterapija. Farmakološka terapija doprinosi boljoj kontroli bihevioralnih simptoma, poboljšanoj suradljivosti od strane pacijenta te poboljšanju kvalitete života oboljelih od demencije. Antipsihotici se koriste za liječenje psihotičnih simptoma kao što su slušne i vidne halucinacije, deluzije, paranoidne i sumanute ideje, ali i za smirenje neprijateljskog stava, razdražljivosti, emocionalne labilnosti te agresivnosti. Antidepresivi se koriste kod ublažavanja simptoma depresije (depresivno raspoloženje, umor, apatija, gubitak energije i volje). Antikonvulzivni lijekovi su izbor u slučaju nepsihotične agitacije. Problem kod liječenja BPSD-a predstavlja uspostavljanje odgovarajuće terapije (kombinacija lijekova) te odgovarajućih doza, posebice zbog nuspojava lijekova koje su najizraženije kod starije populacije. Cilj liječenja BPSD-a jest postići ravnotežu između nuspojava i učinkovitosti farmakoterapije te brojnim socijalnim aktivnostima i bihevioralnom terapijom poboljšati suradljivost i kakvoću života bolesnika.

1.2.2. Genetičke studije vezane za razvoj bihevioralnih i psiholoških simptoma u demenciji

Sama etiologija BPSD-a je još uvijek nepoznata, a dosadašnje studije većinom su bile koncentrirane na neurotransmitterske sustave, tj. na ulogu serotonina (5-HT) (Lanctot i sur., 2001), dopamina (DA) (Sweet i sur., 1998), noradrenalina (NA) (Herrmann i sur., 2004), acetilkolina (Ach) (Minger i sur., 2000) te GABA-e (Lanctot i sur., 2004) u razvoju ovih simptoma.

Genetička istraživanja koja se tiču uloge pojedinih gena u razvoju BPSD-a najviše su se fokusirala na ulogu gena za apolipoprotein (Apo) E u psihozi, depresiji, agresiji i anksioznosti koja prati AB (Borrioni i sur., 2009a; Borrioni i sur., 2006b; Pritchard i sur., 2007; Spalletta i sur., 2006; Zdanys i sur., 2007). Kao potencijalni geni kandidati koji su povezani s BPSD-om istraživani su i geni za proteine uključene u razne neurotransmitterske sustave. Dio istraživanja je pokazao da postoji povezanost 5-HT sustava s agresivnim ponašanjem, psihotičnim simptomima, anksioznošću i depresijom kod osoba oboljelih od AB-a (Lanctot i sur., 2001).

Dosadašnja istraživanja uloge gena 5-HT sustava u razvoju BPSD-a kod dementnih osoba fokusirala su se na tri gena: gene koji kodiraju za 5-HT receptore 5-HT_{2A} (Angelucci i sur., 2009; Assal i sur., 2004; Holmes i sur., 2003; Lam i sur., 2004; Nacmias i sur., 2004; Rocchi i sur., 2003; Wilkosz i sur., 2007) i 5-HT_{2c} (Assal i sur., 2004; Holmes i sur., 2003) te na gen koji kodira za 5-HT transporter (5-HTT) (Albani i sur., 2009; Assal i sur., 2004; Borrioni i sur., 2006b; Grunblatt i sur., 2009; Quaranta i sur., 2009; Rocchi i sur., 2003; Sukonick i sur., 2001; Sweet i sur., 2001; Ueki i sur., 2007).

DA sustav, tj. geni koji kodiraju za pojedine komponente ovog sustava također su zanimljivi za istraživače zbog njihove potencijalne uloge u razvoju BPSD-a. U ove gene ubrajamo gen koji kodira za enzim ključan u katabolizmu DA, katehol-O-metiltransferazu (COMT), te gene koji kodiraju za različite receptore DA i DA transporter (DAT1). Većina provedenih studija o povezanosti gena COMT s BPSD-om tiču se uloge polimorfizma Val^{108/158}Met u razvoju ovih simptoma (Borrioni i sur., 2004; Borrioni i sur., 2006b; Borrioni i sur., 2006c; Borrioni i sur., 2007; Sweet i sur., 1998). Istraživanja uloge

DA receptora (DRD) u razvoju BPSD-a obuhvaćaju analize polimorfizama u genu za DRD1 (Holmes i sur., 2001; Pritchard i sur., 2009; Sweet i sur., 1998), DRD2 (Pritchard i sur., 2009; Sweet i sur., 1998), DRD3 (Craig i sur., 2004; Holmes i sur., 2001; Pritchard i sur., 2009; Sato i sur., 2009; Sweet i sur., 1998) i DRD4 (Grunblatt i sur., 2009; Sweet i sur., 1998). U slučaju gena koji kodira za DAT1 u literaturi su prisutna istraživanja koja se odnose na ulogu polimorfizma u 3' netranslatirajućoj regiji gena (Pritchard i sur., 2008).

U literaturi su prisutna i istraživanja uloge polimorfnih regija nekih drugih gena u razvoju nekognitivnih simptoma demencije. Spomenuta istraživanja odnose se na gen koji kodira za interleukin (IL)-1 β , glutation-S-transferazu, triptofan hidrosilazu, monoaminoooksidazu A, neuregulin-1, moždani neurotrofni čimbenik (BDNF, engl. *Brain-Derived Neurotrophic Factor*), itd.

1.3. Tipovi demencije

AB je najčešći oblik demencije i na nju otpada oko 60-70% slučajeva demencije u Europi (Fratiglioni i sur., 2000) (Slika 2). Oko 15-20% demencija otpada na vaskularnu demenciju, a 10-25% na ostale oblike demencije (Fratiglioni i sur., 2000) (Slika 2). Primarne demencije su puno češće pa je njihov udio u svim slučajevima demencije vjerojatno veći od 90%, dok je udio sekundarnih demencija ispod 10% (Slika 2).

1.3.1. Alzheimerova bolest

Prije više od 100 godina (1906. god.) Alois Alzheimer je opisao prvi slučaj progresivnog intelektualnog propadanja u bolesnice stare 51 godinu. A. Alzheimer je prvi povezoao primijećene simptome gubitka pamćenja, poremećaja govora te simptome promjene osobnosti sa specifičnim histološkim promjenama u mozgu (atrofija moždane kore, gubitak neurona, pojava tzv. senilnih plakova i neurofibrilarnih snopića).

Još uvijek nije poznat točan uzrok AB-a, ali je poznato da postoje određeni čimbenici rizika koji pridonose pojavi bolesti. Kao potencijalni čimbenici rizika za AB spominju se visoka životna dob, genetička predispozicija, spol, kardiovaskularni faktori, prisutnost blagog kognitivnog (spoznajnog) poremećaja (MCI, engl. *Mild Cognitive Impairment*), način života (prehrana, tjelesna aktivnost, pušenje, konzumiranje alkohola, itd.), stres, trauma glave, upalni procesi, dijabetes, depresija te okolišni čimbenici (Forero i sur., 2006b; Fratiglioni i sur., 1993; Gao i sur., 2013; Grant i sur., 2002; Kivipelto i sur., 2005a; Kroner, 2009; Li i sur., 2011; Musicco, 2009; Pendlebury i Rothwell, 2009; Serretti i sur., 2007; Slegers i sur., 2004; Tuppo i Arias, 2005; Van Den Heuvel i sur., 2007; Whitmer i sur., 2008).

Razlikujemo dva tipa AB-a, sporadični i obiteljski oblik. Kada se AB javi kod više osoba unutar jedne obitelji tada govorimo o obiteljskom obliku AB-a, dok se sporadični oblik javlja samo kod jedne osobe unutar obitelji u kojoj nema drugih zabilježenih slučajeva ove bolesti. AB se dalje dijeli i prema dobi u kojoj su se javili prvi simptomi bolesti na AB s ranim početkom (prije 65. godine života) i AB s kasnim početkom (nakon 65. godine života). Sporadični oblik AB-a se najčešće javlja nakon 65. godine života dok se obiteljski oblik češće javlja prije 65. godine života. Obiteljski oblik je vrlo rijedak u populaciji i ima izraženu genetičku podlogu.

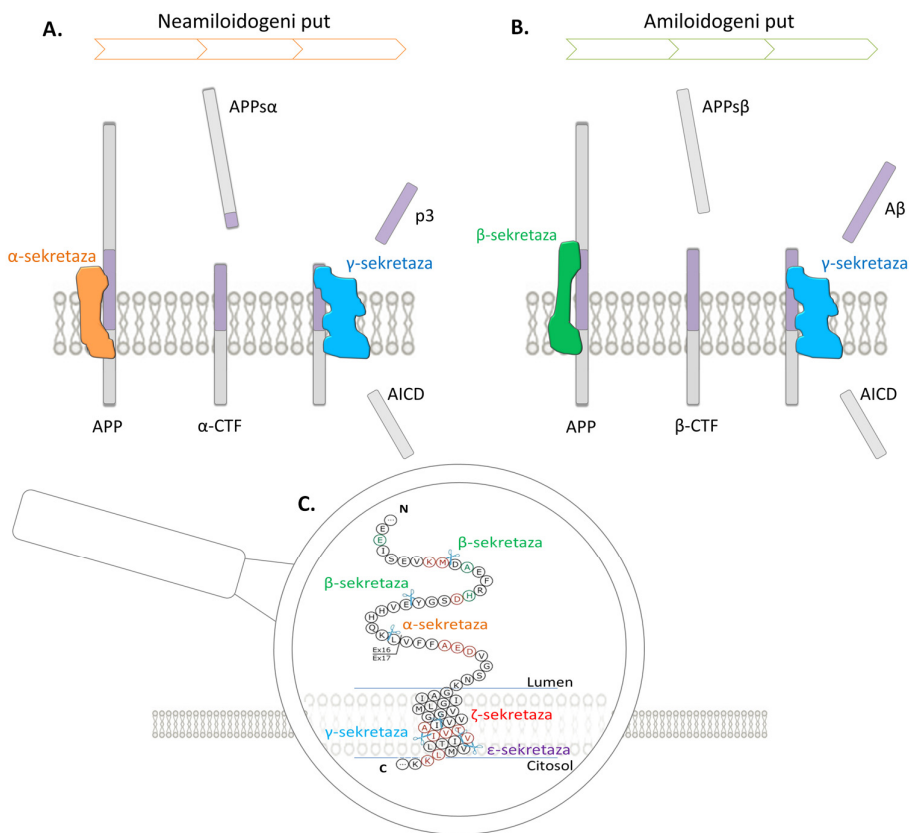
1.3.1.1. Genetički čimbenici rizika

Obiteljski oblik AB-a te AB s ranim početkom povezani su s mutacijama u trima genima: genu koji kodira za prekursor proteina amiloid- β (APP), te genima koji kodiraju za presenilin (PSEN) 1 i PSEN2. S pojavom sporadičnog oblika AB-a povezuju se i polimorfizmi u genu koji kodira za serumski lipoprotein ApoE, ali i polimorfizmi nekih drugih gena, kao što su geni za proteine koji sudjeluju u

mehanizmima oksidacijskog stresa i mehanizmima upale, geni koji kodiraju za različite lipoproteine i njihove receptore te geni koji kodiraju za komponente neurotransmiterskih puteva.

Prekursor proteina amiloid- β (APP)

Gen za APP nalazi se na 21. kromosomu, a kodira za transmembranski glikoprotein koji se nakon sinteze na ribosomima translocira u endoplazmatski retikulum (ER) i dalje u centralne sekretorne putove. Iz Golgijevog aparata (GA), APP se dalje prenosi na površinu stanice ili izravno u endosome. APP na površini stanice cijepa α -sekretaza te zatim γ -sekretaza (neamiloidogeni put) pri čemu ne nastaje protein amiloid- β ($A\beta$) (Slika 4). Cijepanje APP-a unutar endosoma putem enzima β -sekretaze, a zatim i γ -sekretaze daje $A\beta$ (amiloidogeni put) koji se dalje izlučuje u izvanstanični prostor ili se razgrađuje u lizosomima (Slika 4). Peptidi $A\beta$ koji nastaju najčešće imaju 40 ($A\beta_{40}$), odnosno 42 ($A\beta_{42}$) aminokiseline.



Slika 4. Cijepanje prekursora proteina amiloid- β (APP).

A. neamiloidogeni put cijepanja APP-a; **B.** amiloidogeni put cijepanja APP-a; **C.** prikaz mjesta cijepanja različitih sekretaza te prikaz položaja pojedinih mutacija na razini proteina APP.

A β_{42} forma je izrazito amiloidogena i neurotoksična, a istraživanja upućuju na to da se koncentracija ovog peptida povećava u moždanom tkivu osoba koje boluju od AB-a (Steinerman i sur., 2008), a smanjuje u cerebrospinalnoj tekućini (CSF) (Shaw i sur., 2009). Kod osoba oboljelih od AB-a dolazi do nakupljanja A β_{42} te nastanka ljepljivih i netopivih amiloidnih plakova u izvanstaničnom prostoru, a smanjeni odnos A β_{42} /A β_{40} također se može koristiti kao dobar pokazatelj progresije bolesti (Findeis, 2007). Prema bazi podataka „The Alzheimer Disease & Frontotemporal Dementia Mutation Database (AD&FTDMDDB)“ (<http://www.molgen.vib-ua.be/ADMutations>), koja skuplja podatke o svim poznatim mutacijama u genima vezanima za nastanak AB-a i FTD-a, danas su identificirane 33 mutacije u genu koji kodira za APP, a dio tih mutacija, koje se nalaze u eksonu 16 i 17, pokazale su se patogenima (Slika 4). Radi se o mutacijama krivog smisla koje rezultiraju zamjenom jedne aminokiseline drugom. Dio tih mutacija nalazi se u blizini mjesta cijepanja γ -sekretaze (kodoni 713-717) te unutar transmembranske domene APP-a (Goate i sur., 1991). Suzuki sa suradnicima (1994) pokazao je da mutacija unutar kodona 717 povećava udio A β_{42} za 1,5 do 1,9 puta. Mutacije unutar kodona 670 i 671 nalaze se unutar mjesta cijepanja β -sekretaze te na izvanstaničnom dijelu proteina APP (Mullan i sur., 1992). Mutacija, koja rezultira zamjenom aminokiseline glicin (Gly) aminokiselinom alanin (Ala) u kodonu 692, nalazi se unutar same sekvence A β u blizini mjesta gdje cijepa α -sekretaza, a pronađena je kod pacijenata koji imaju cerebralna krvarenja ili AB s ranim početkom (Hendriks i sur., 1992). Mutacija na kodonu 693, koja rezultira zamjenom glutaminske kiseline (Glu) aminokiselinom glutamin (Gln), prisutna je kod rijetkog autosomalnog dominantnog poremećaja pronađenog kod nekoliko obitelji u Nizozemskoj (Bakker i sur., 1991), a radi se o nasljednom cerebralnom krvarenju s amiloidozom - nizozemski tip (HCHWA-D, engl. *Hereditary Cerebral Hemorrhage With Amyloidosis - Dutch type*).

Presenilin 1 i 2 (PSEN 1 i PSEN 2)

Geni PSEN1 i PSEN2 kodiraju za integralne membranske proteine koji se sastoje od 8 transmembranskih domena (Doan i sur., 1996), a većinom su smješteni na membrani hrapavog ER-a i jednim dijelom u GA (Kovacs i sur., 1996; Walter i sur., 1996). Gen PSEN1 smješten je na dužem kraku kromosoma 14 te sadrži 10 kodirajućih eksona. Gen PSEN2 nalazi se na duljem kraku kromosoma 1 te također ima 10 kodirajućih eksona. Ova dva gena su homologna (67%) unatoč tome što je PSEN2 puno manji, a glavna razlika proizlazi iz intronskih sekvenci i njihove duljine. Unutar transmembranskih domena homologija ovih dvaju proteina doseže i 95% (Cruts i sur., 1996). Oba proteina su prisutna u raznim tkivima ljudskog organizma, uključujući i SŽS. Presenilini su vrlo važne komponente γ -sekretaze, koja, između ostalog, katalizira i cijepanje APP-a te sudjeluju u regulaciji Wnt-signaliziranja destabilizacijom β -katenina. Do danas je identificiran veliki broj mutacija u genima PSEN1 i PSEN2 koje imaju različit utjecaj na uloge koje ovi proteini imaju u organizmu. U Tablici 1 navedene su poznate mutacije gena za preseniline i njihov utjecaj na nastanak A β_{40} i A β_{42} te razinu unutarstaničnih domena proteina APP (AICD, engl. *APP Intracellular Domain*). Većina mutacija u genima PSEN1 i PSEN2 rezultira smanjenjem funkcije proteina i povećanjem razine A β_{42} te smanjenjem razine A β_{40} i AICD-a (Tablica 1).

Tablica 1. Utjecaj mutacija u genima za presenilin 1 (PSEN 1) i presenilin 2 (PSEN 2) na razine proteina amilod- β ($A\beta_{40}$ i $A\beta_{42}$) i razinu unutarstaničnih domena proteina APP (AICD).

Tablica je napravljena prema uzoru na rad koautora Shen i Kelleher (2007).

Mutacije u genima za presenilin 1 i 2	$A\beta_{40}$	$A\beta_{42}$	AICD
PSEN1			
A79V	↓	○	
$\Delta 183/\Delta M84$			
C92S			
Y115H			
N135D	↓	↑	
I143T	↓	↑	
M146L	○	↑	○
M146V	○	↑	↓
H163V	○	↑	
L166P	↓	↑/○	↓
L166R			↓
G206A	○	↑	↓
G209V	○	↑	○
I229F			↓
A321V	↓	○	
M233L			↓
M233Z	↓	↑	↓
M233V			↓
F2371I			↓
A246E	○	↑	
P264L	↓	↑	
L286V			
$\Delta ex9$	↓	↑/○	↓
InsR352	↓	↓	
G384A	↓	↑	
L392V	○	↑	↓
C410Y	↓	↑	↓
PSEN2			
T122P	↓	↑	↓
N141I	↓	↑/○	↓
M239V	↓	↑	↓
M239I	↓	↑	↓

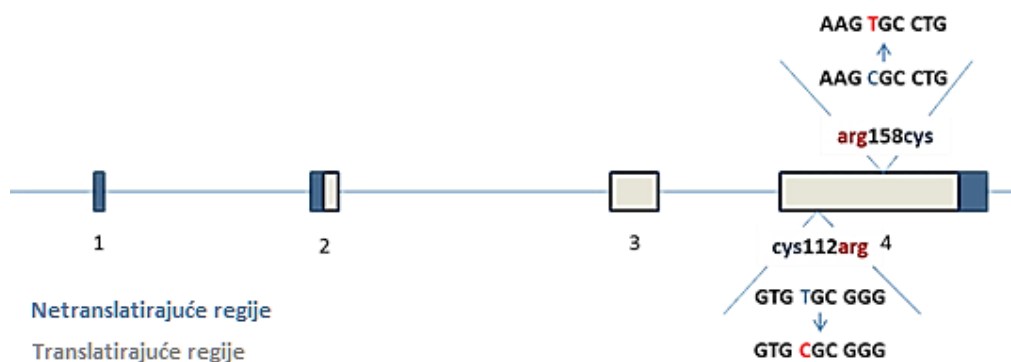
Povećanje razine pojedinih komponenti prikazano je sa strelicom okrenutom prema gore (↑), a smanjenje sa strelicom okrenutom prema dolje (↓). Nepromijenjene razine prikazane su s kružićem (○).

Pretpostavlja se da povećana razina $A\beta_{42}$ inhibira aktivnost γ -sekretaze okupirajući aktivno mjesto enzima (za cijepanje na još kraće oblike $A\beta$), time imitirajući učinak mutacija u genu za preseniline (Shen i Kelleher, 2007). Povećane razine $A\beta$ mogu djelovati i tako da inhibiraju ekspresiju gena za γ -sekretazu jer $A\beta$ inhibira ekspresiju gena koji su regulirani cikličkim adenozin-monofosfatom (cAMP) i sadrže cis-aktivnu sekvencu s funkcijom elementa koji reagira na djelovanje cAMP-a (CRE, engl. *cAMP Response Element*). CRE na sebe veže transkripcijski faktor CRE-vezujući protein (CREB, engl. *CRE Binding Protein*).

Apolipoprotein E (ApoE)

Gen koji kodira za ApoE smješten je na kromosomu 19 i sastoji se od 4 eksona (Slika 5) koji se pružaju u duljini od 3,7 kb (Paik i sur., 1985). ApoE je glikoprotein koji se sintetizira u različitim tkivima, a ponajviše u jetri i moždanom tkivu. U mozgu, ApoE pretežito sintetiziraju mikroglia stanice i astrociti (Grehan i sur., 2001; Pitas i sur., 1987). ApoE igra ulogu liganda u endocitozi lipoproteinskih čestica posredovanoj receptorima te se ugrađuje u lipoproteinske čestice i regulira njihov katabolizam (Pitas i sur., 1987). Glavni apolipoprotein u SŽS-u, koji se nalazi u sklopu lipoproteina visoke gustoće (HDL, engl. *High Density Lipoprotein*), je ApoE (Pitas i sur., 1987). Kolesterol koji se otpušta iz lipoproteinskih čestica koje sadrže ApoE koristi se da bi podržao sinaptogenezu i održavanje sinaptičkih veza (Pfrieger, 2003). Smatra se da je ApoE uključen u metabolizam i redistribuciju kolesterola i fosfolipida tijekom modeliranja membrana jer veže i prenosi lipide bogate kolesterolom u stanice interakcijom s njihovim receptorima (Holtzman i sur., 1995; Nathan i sur., 1994). U SŽS-u nalaze se i drugi apolipoproteini kao što su: ApoA-I, ApoA-II, ApoA-IV, ApoD, ApoH i ApoJ.

U genu koji kodira za ApoE pronađeno je više različitih polimorfizama (Nickerson i sur., 2000). Dva najčešća polimorfizma u genu za ApoE (Slika 5) u konačnici rezultiraju s tri izoforme ovog proteina: ApoE2 (na poziciji 112 i 158 nalazi se aminokiselina cistein), ApoE3 (na poziciji 158 je aminokiselina arginin) i ApoE4 (aminokiselina arginin nalazi se i na poziciji 112 i 158). Ove promjene u primarnoj strukturi proteina rezultiraju promjenama u strukturi i funkciji istog (Mahley i sur., 2006). Alel E4 povezuje se sa sporadičnim i obiteljskim oblikom AB-a (St Clair i sur., 1995). Osobe koje su nosioci jednog alela E4 imaju 2 do 3 puta veći rizik za obolijevanje od AB-a, a kod osoba koji su nosioci dva alela E4 taj se rizik povećava do 12 puta (Bertram i sur., 2009; Roses, 1996). Ovaj alel se također povezuje i s ranijim početkom bolesti (GomezIsla i sur., 1996; Roses, 1996) dok se alel E2 povezuje sa smanjenim rizikom za razvoj AB-a (Corder i sur., 1994; Farrer i sur., 1997). Unatoč tome što se alel E4 povezuje s razvojem AB-a, on sigurno nije dovoljan, niti je njegovo prisustvo ključno da bi došlo do razvoja bolesti. On može ubrzati progresiju bolesti i dovesti do ranije pojave simptoma (Betard i sur., 1994).



Slika 5. Struktura gena za protein apolipoprotein E i položaj najčešćih polimorfizma u tom genu.

Poznato je da postoji pozitivna korelacija između doze alela E4 i gustoće amiloidnih plakova (Tiraboschi i sur., 2004). Kod osoba koje nemaju kognitivnih oštećenja, a nalaze se u srednjoj životnoj dobi, pokazano je da postoji negativna korelacija između broja alela E4 i količine $A\beta_{42}$ u CST-u (Sunderland i sur., 2004). Kod osoba kod kojih dolazi do akumulacije $A\beta$ i nastanka amiloidnih plakova prisutna je i snižena koncentracija $A\beta_{42}$ u CST-u (Fagan i sur., 2006). Ovo upućuje na zaključak da akumulacija $A\beta$ započinje ranije kod osoba koje su nosioci alela E4 (Kim i sur., 2009). Jedna od hipoteza je da ApoE ima važnu ulogu kao protein koji veže $A\beta$ i sudjeluje u njegovoj agregaciji omogućavajući konformacijske promjene koje tome prethode (Wisniewski i Frangione, 1992). Neke studije su pokazale da varijanta E4 stvara stabilnije komplekse s $A\beta$ u odnosu na varijantu E3 (Strittmatter i sur., 1993)

1.3.1.2. Negenetički čimbenici rizika

Postoji više različitih negenetičkih čimbenika rizika koji su do sada istraživani, a povezani su s povećanim rizikom za oboljenje od AB-a. Ovi negenetički čimbenici rizika odnose se na: pušenje, konzumaciju alkohola, prekomjernu tjelesnu težinu i pretilost, hipertenziju, hiperkolesterolemiju, lošu prehranu, šećernu bolest, kardiovaskularne i cerebrovaskularne bolesti, razinu edukacije pojedinaca, socioekonomski status, fizičku i mentalnu aktivnost (Povova i sur., 2012). Dob se smatra najbolje potvrđenim i najvažnijim čimbenikom rizika za razvoj sporadičnog oblika AB-a.

Pušenje se pokazalo kao rizičan faktor za razvoj AB-a, posebice kod osoba koje nisu nosioci E4 alela (Aggarwal i sur., 2006; Merchant i sur., 1999; Ott i sur., 1998), a isti slučaj je i s prekomjernom zlouporabom alkohola. Poznata je činjenica da osobe s dijagnozom ovisnosti o alkoholu često pate i od demencije uzrokovane dugogodišnjom zlouporabom alkohola. Osobe u srednjoj životnoj dobi, ovisne o alkoholu, imaju oko 3 puta veći rizik da razviju demenciju (Anttila i sur., 2004).

Povišeni indeks tjelesne mase ili pretilost, što se posebice odnosi na abdominalnu pretilost, u srednjoj životnoj dobi dodatno pridonose pojavi demencije u starijoj životnoj dobi (Kivipelto i sur., 2005b; Rosengren i sur., 2005; Whitmer i sur., 2005). Slična situacija je i s povišenim krvnim tlakom.

Dio studija je povezoao povišeni krvni tlak s većim rizikom od razvoja AB-a kod osoba koje nisu primale adekvatnu terapiju (Kivipelto i sur., 2005a; Launer i sur., 2000). Kod osoba kod kojih je hipertenzija držana pod kontrolom, pomoću antihipertenziva, pokazano je da ovi lijekovi zapravo mogu imati protektivan učinak u slučaju razvoja demencije u kasnijoj životnoj dobi (Khachaturian i sur., 2006; Yasar i sur., 2005). Hiperkolesterolemija, tj. povišena razina kolesterola u serumu, smatra se također jednim od rizičnih faktora za razvoj AB-a (Kivipelto i sur., 2002; Whitmer i sur., 2005), a smanjena razina serumskog kolesterola u kasnijoj životnoj dobi predložena je kao jedan od biomarkera za dijagnozu AB-a i ostalih oblika demencije (Solomon i sur., 2007). Statini koji se koriste za snižavanje razine kolesterola u krvi predloženi su kao, potencijalno dobar, oblik preventivne terapije u demenciji (Haag i sur., 2009; Jick i sur., 2000; Rockwood i sur., 2002). Smatra se da bi statini mogli djelovati na produkciju peptida A β u moždanom tkivu. Prehrana bogata antioksidansima, kao što su vitamin E i C, mogla bi također preventivno djelovati na razvoj demencije (Barberger-Gateau i sur., 2007; Zandi i sur., 2004), dok bi prehrana bogata zasićenim masnim kiselinama i kolesterolom mogla imati upravo suprotan učinak (Laitinen i sur., 2006). Veća učestalost neurodegeneracije i VaD-a pronađena je kod osoba koje boluju od šećerne bolesti ili dijabetesa (Akomolafe i sur., 2006; Arvanitakis i sur., 2004; Biessels i sur., 2006). Ova povezanost mogla bi se objasniti hipertenzijom i dislipidemijom kod osoba sa šećernom bolesti. Kod osoba koje boluju od kardiovaskularnih bolesti također je uočena povećana incidencija AB-a, posebice kod osoba s perifernom aterosklerozom (Beeri i sur., 2006; Newman i sur., 2005). Također, cerebrovaskularne lezije, ateroskleroza te neurodegenerativne promjene često se pojavljuju zajedno rezultirajući razvojem demencije (Esiri i sur., 1999; Snowdon i sur., 1997).

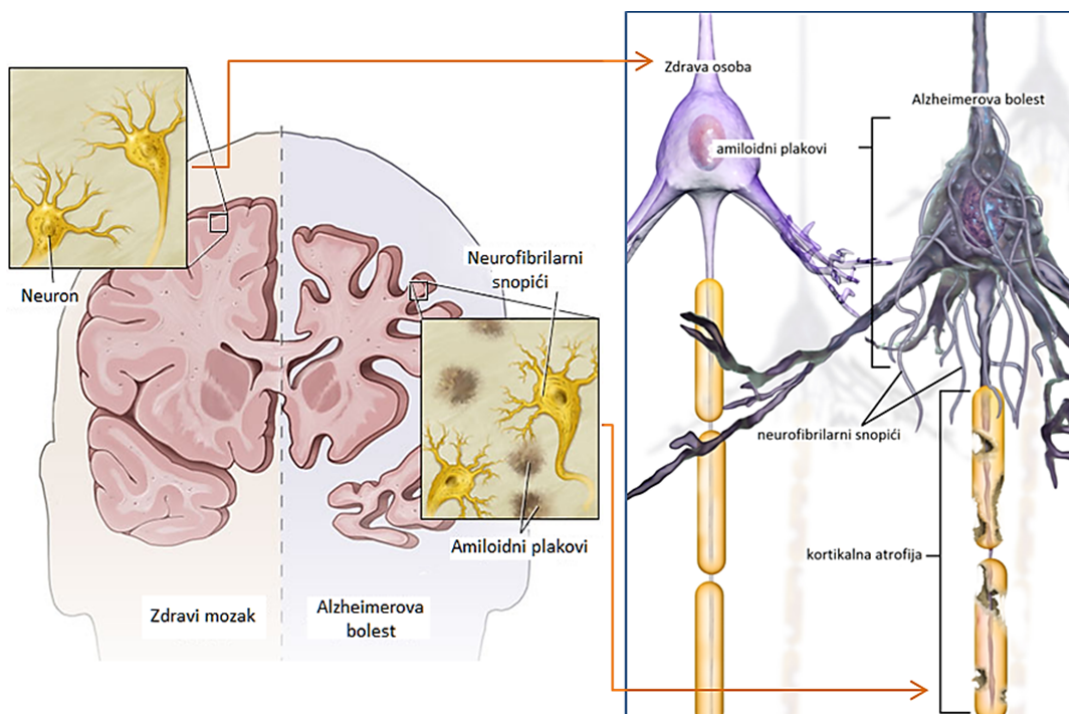
Od psihosocijalnih faktora važnih u razvoju demencije ističe se važnost razine obrazovanja kod pojedinaca. Pokazano je da osobe koje imaju višu razinu obrazovanja rjeđe obolijevaju od demencije (Ngandu i sur., 2007; Qiu i sur., 2001). Također, smatra se da je i uključenost pojedinca u društvene obaveze važan čimbenik kod razvoja demencije u kasnijoj dobi, tj. istraživanja pokazuju da osobe koje imaju slabije socijalne kontakte te žive više izoliranim životom imaju i veći rizik za razvoj AB-a (Saczynski i sur., 2006; Wang i sur., 2002). Fizička aktivnost mogla bi imati pozitivan učinak na kognitivne sposobnosti pojedinca, tj. redovita fizička aktivnost mogla bi odgoditi pojavu simptoma demencije u starosti (Larson i sur., 2006), a isto vrijedi i za mentalnu aktivnost (Crowe i sur., 2003).

Svi navedeni rizični čimbenici upućuju na to da bi promjena načina života i bolja skrb pojedinca o samom sebi u ranijoj životnoj dobi mogla imati protektivni učinak na razvoj demencije u kasnijoj životnoj dobi.

1.3.1.3. Patogeneza Alzheimerove bolesti

AB karakteriziraju određene anatomske promjene moždanog tkiva, a one se odnose na smanjeni volumen i masu moždane kore, pojavu difuznih atrofičnih vijuga u frontalnim i temporalnim režnjevima mozga te gubitak neurona u kori velikog mozga i subkortikalnim regijama koje su odgovorne za pamćenje i govor (Wenk, 2003).

Histopatološke značajke koje se trenutačno uzimaju u obzir pri dijagnozi AB-a su izvanstanično nakupljanje amiloidnih plakova te pojava unutarstaničnih neurofibrilarnih snopića (Consensus Criteria, 1997) (Slika 6). Danas je poznato da AB karakteriziraju i degeneracija sinapsi, gubitak hipokampalnih neurona te aneuploidija. Nažalost, patološke analize moždanog tkiva kod starijih, preminulih, ali nedementnih osoba također pokazuju jednake histopatološke promjene koje se povezuju s AB-om (Swerdlow, 2007), što predstavlja problem u pouzdanosti uspostavljanja dijagnoze AB-a. Ovakve osobe često se svrstava pod pojam pretkliničkog stadija AB-a (Price i sur., 2001). Danas postoji više različitih teorija kojima se pokušava objasniti uzrok AB-a, ali niti jedna teorija do sada nije dala odgovor na sva pitanja.



Slika 6. Histopatološke promjene koje se povezuju s Alzheimerovom bolešću.

Amiloidna hipoteza kao osnovni patofiziološki čimbenik nastanka AB-a navodi nakupljanje A β te nastanak senilnih plakova u izvanstaničnom prostoru (Eckman i Eckman, 2007; Hardy, 2009; Hardy i Higgins, 1992). Međutim, uvijek se postavlja pitanje da li su amiloidni plakovi uzrok bolesti ili samo posljedica nekog drugog uzročnog čimbenika. Ova teorija ponajviše se odnosi na slučajeve AB-a koji su posljedica autosomalne dominantne mutacije gena za APP, ali pitanje je da li je ova teorija primjenjiva na oblik AB-a s kasnim početkom.

Drugi dio studija fokusirao se na tzv. tau hipotezu, tj. hipotezu koja kao glavni okidač AB-a navodi nastanak neurofibrilarnih snopića kao posljedice hiperfosforilacije proteina tau (Small i Duff, 2008). Kod normalnih diferenciranih stanica protein tau je nefosforiliran i važan je u stabilizaciji mikrotubula i citoskeleta, a u slučaju njegove fosforilacije (koja je karakteristična za nediferencirane stanice) dolazi do destabilizacije mikrotubula i samog citoskeleta stanice (Mandelkow i Mandelkow, 1994; Marx, 2007; Meraz-Rios i sur., 2010).

Teorija mitohondrijske disfunkcije razvila se iz zapažanja da kod osoba s AB-om dolazi do strukturalnih i funkcionalnih promjena mitohondrija i da ta patologija nije ograničena samo na moždano tkivo (Parker i sur., 1990; Swerdlow i Khan, 2004; Swerdlow i Kish, 2002). Ova teorija predlaže da se slični fiziološki mehanizmi nalaze u pozadini starenja mozga i AB-a te predlaže da je sama mitohondrijska disfunkcija uzročnik nastanka amiloidnih plakova te fosforilacije proteina tau. Predloženi su i dodatni mehanizmi koji doprinose mitohondrijskoj disfunkciji u neurodegenerativnim bolestima, kao što su oksidativni stres i disfunkcija proteasoma (Ding i sur., 2006).

1.3.2. Vaskularna demencija

VaD podrazumijevaju gubitak kognitivnih funkcija na način da to utječe na svakodnevno izvršavanje obaveza kod pojedinca, a koje je posljedica različitih cerebrovaskularnih incidenata ili patološke promjene krvnih žila mozga koji dovode do oštećenja dijelova mozga ključnih u pamćenju, kogniciji i ponašanju (Roman, 2002). Nakon AB-a, VaD se smatra najčešćim oblikom demencije jer na nju otpada oko 20% svih slučajeva demencije u svijetu (Dubois i Hebert, 2001).

Danas su često pod dijagnozu VaD-a uključeni i višestruki patofiziološki mehanizmi koji se mogu povezati s deficijencijom moždanog tkiva u opskrbi krvlju i različitim vrstama patologije. Tu ubrajamo višestruke infarkte (koji nastaju uslijed ateroskleroze velikih krvnih žila i embolije), solitarne strateške infarkte, lakunarne infarkte, promjene bijele tvari uslijed bolesti malih krvnih žila, hipoperfuziju, intermitentnu ishemiju, abnormalnu vaskularnu permeabilnost, hemoragiju, hipertenzivnu vaskulopatiju, ishemiju nakon rupture aneurizme, arteritis uslijed različitih autoimunih i infektivnih poremećaja, kolagenoze, itd.

Zbog sličnosti u patogenezi, čimbenicima rizika te komorbiditetima ponekad je vrlo teško razlikovati VaD od AB-a (Reed i sur., 2004). U pravilu se kod VaD-a vrlo rano javljaju simptomi poremećene motorike te percepcije, a za razliku od AB-a, nerijetko se VaD javlja i kod mlađih osoba (osoba u srednjoj životnoj dobi), makar je puno učestaliji s porastom životne dobi (posebice kod osoba starijih

od 70 godina) (Lee, 2011). Za razliku od AB-a, kod VaD-a su kognitivna oštećenja kasnije vidljiva, a sama bolest može nastupiti postepeno, makar se simptomi puno češće pojavljuju vrlo naglo (Lee, 2011).

Dijagnoza VaD-a temelji se na kliničkim, neuroslikovnim te patološkim podacima. Problem kod VaD-a je vrlo velika heterogenost fenotipova. Tri osnovna elementa na kojima se bazira dijagnoza ovog oblika demencije su: prisutnost demencije ili kognitivnog oštećenja, dokazi o prisustvu kardiovaskularnih oboljenja te uzročno-posljedična veza između spomenutih kardiovaskularnih oboljenja i pojave kognitivnog oštećenja. Pri dijagnozi VaD-a najčešće se koriste DSM-IV kriteriji (APA, 2000), MKB-10 kriteriji (WHO, 2010) i kriteriji koje daju Dijagnostički i terapijski centri za Alzheimerovu bolest (ADDTC, engl. *Alzheimer's Disease Diagnostic and Treatment Centers*) (Chui i sur., 1992) te Nacionalni institut za neurološke poremećaje i udar - Međunarodna udruga za istraživanja i obrazovanje u neuroznanosti (NINDS-AIREN, engl. *National Institute for Neurological Disorders and Stroke - Association Internationale pour la Recherche et l'Enseignement en Neurosciences*) (Roman i sur., 1993). Niti jedan od navedenih skupova kriterija za dijagnozu VaD-a nije dovoljno specifičan niti dovoljno osjetljiv upravo zbog velikih razlika u kliničkoj prezentaciji ovog oblika demencije. U slučaju da neuroslikovne metode, kao što su CT i MRI, pokažu izostanak cerebralnih vaskularnih lezija, tada možemo biti sigurni da se ne radi o VaD-u. Kod osoba s dijagnozom VaD-a navedene metode s velikom sigurnošću prikazuju žarišta hiperintenziteta i infarkte koji su najčešće smješteni u bazalnim ganglijima.

Rano otkrivanje kognitivnih simptoma nastalih zbog vaskularnih oštećenja moždanog tkiva u ranoj fazi VaD-a te ozbiljna kontrola vaskularnih rizičnih čimbenika, posebice u srednjoj životnoj dobi, predstavlja osnove u prevenciji ovog oblika demencije. U slučaju kada je bolest već nastupila, cilj daljnje terapije je pokušati usporiti njeno napredovanje, poboljšati kognitivne funkcije i spriječiti nastanak novih infarkta.

1.3.3. Frontotemporalna demencija

FTD je klinički i patološki heterogena skupina demencija koje se ne mogu definirati kao AB, a karakterizira ih selektivna i progresivna atrofija frontalnih i/ili temporalnih režnjeva (Rabinovici i Miller, 2010).

Simptomi koji karakteriziraju FTD ovise o anatomskej raspodjeli patoloških promjena. U slučaju kada su simetrično zahvaćena oba čeona i prednja dijela sljepoočnih režnjeva nastaje tzv. tipičan oblik FTD-a, dok u slučaju kada je patološkim promjenama asimetrično zahvaćena samo dominantna hemisfera dolazi do sindroma primarne progresivne afazije. Bolesnici s primarnom progresivnom afazijom pokazuju simptome jezičnog poremećaja koji su karakterizirani ili poremećenim jezičnim funkcijama u smislu produkcije govora (pa govorimo o netečnoj afaziji koja ponekad uključuje akalkuliju, ideomotornu apraksiju i čistu gluhoću za riječi) ili su karakterizirani poremećajem razumijevanja te semantičkom memorijom (pa govorimo o semantičkoj demenciji). Asimetrično

zahvaćanje desne hemisfere u FTD-u dovodi do nastanka psihotičnih simptoma, nekontrolirane impulzivnosti i disinhibicije, a pretežno zahvaćanje obaju temporalnih režnjeva do sindroma tečne ('stražnje') afazije s asocijativnom vidnom agnozijom.

U usporedbi s AB-om, FTD se najčešće javlja već u srednjoj životnoj dobi, a kognitivne sposobnosti su u početnim fazama bolesti još uvijek dobro očuvane (Warren i sur., 2013). Bihevioralne promjene te promjene u osobnosti pojedinaca mogu u početku krivo upućivati na psihijatrijski poremećaj, pogotovo u slučajevima kada se javljaju psihotični simptomi. U ranim fazama FTD-a bihevioralni simptomi i simptomi vezani za govor često se javljaju odvojeno, ali kako bolest napreduje doći će do preklapanja ovih simptoma. Osobe s FTD-om, za razliku od bolesnika s AB-om, u ranim fazama bolesti nemaju problema s memorijom i vremenskom orijentacijom, već se ovi simptomi karakteristični za demenciju javljaju u kasnijim stadijima bolesti.

Napredak u genetičkim i molekularnim istraživanjima omogućio je razlikovanje četiri biološka podtipa FTD-a: tipičan oblik FTD-a, dvije čiste tauopatije (FTD s parkinsonizmom (FTDP-17) i Pickova bolest) te FTD s bolešću motoneurona. Ipak, budući da se korištenjem sadašnjih dijagnostičkih metoda ne može još uvijek dovoljno pouzdano donijeti premortalna dijagnoza pojedinih podtipova FTD-a, prijedlog je da se i dalje u dijagnostici koristi širi pojam ove bolesti. Korištenje neuroslikovnih metoda u dijagnozi FTD-a je ključno kako bi se eliminirali svi ostali mogući uzroci uočenih simptoma demencije (kao što su ostali oblici demencije ili tumori). Ključni kriterij za dijagnozu tipičnog oblika FTD-a je odsutnost unutarstaničnih nakupina proteina tau i ubikvitina (kao što su neurofibrilarni snopići u AB-u), argirofilnih zrnaca te Pickovih ili Lewyjevih tjelešaca (Warren i sur., 2013). Bolest obično nastupa nakon 40., ali prije 65. godine starosti.

Za sada ne postoji terapija koja bi se mogla koristiti za liječenje FTD-a već su terapijske intervencije usmjerene na ublažavanje pojedinih simptoma bolesti kako bi se teret bolesti maksimalno olakšao pacijentima i njihovim skrbnicima.

1.3.4. Bolest Lewyjevih tjelešaca

DLB je vrsta demencije koja pokazuje određene simptome PB-a te simptome AB-a. DLB se najčešće javlja u kasnijoj životnoj dobi (kod osoba s 75-80 godina starosti). Lewyjeva tjelešca, karakteristična za ovaj oblik demencije, zapravo su male citoplazmatske, eozinofilne, ubikvitin-pozitivne nakupine α -sinukleina u neuronima (Baba i sur., 1998; Chartier-Harlin i sur., 2004; McKeith, 2004), koje u konačnici dovode do odumiranja neurona najvjerojatnije putem mehanizama koji uključuju oštećenje sinapsi i disfunkciju mitohondrija. Težina demencije proporcionalna je gustoći Lewyjevih tjelešaca.

Danas se smatra da postoji najmanje 18 različitih oblika DLB-a koji su svi karakteriziranih demencijom i različitim stupnjem parkinsonizma. Patološki gledano AB se povezuje s prisustvom amiloidnih plakova i neurofibrilarnih snopića u parijetalnom, temporalnom i parijetalno-okcipitalnom korteksu, dok se PB povezuje s nastankom Lewyjevih tjelešaca u subkortikalnim regijama mozga,

posebice u području substancije nigre (lat. *substantia nigra*) i lokus ceruleusa (lat. *locus coeruleus*). DLB karakterizira pojava Lewyjevih tjelešaca i amiloidnih plakova u subkortikalnim i kortikalnim (frontotemporalnim) regijama mozga, dok je pojava neurofibrilarnih snopića puno rjeđa u ovom obliku demencije (McKeith, 2004; Nussbaum i Ellis, 2003). Također, biokemijski gledano, DLB nalikuje AB-u i Parkinsonovoj bolesti jer i ovaj oblik demencije karakterizira nedostatak Ach i DA (Leverenz i McKeith, 2002). Korištenje neuropsiholoških testiranja te neuroslikovnih tehnika ne omogućuje dovoljno dobro razlikovanje DLB-a od AB-a, a nerijetko se događa da su kod istog pacijenta istovremeno prisutna oba stanja (Knopman i sur., 2001).

Kao osnovne kliničke karakteristike DLB-a ističu se: demencija, delirij te vizualne halucinacije s prisutnim parkinsonizmom (Knopman i sur., 2003). Osobe koje boluju od DLB-a u pravilu imaju više problema s tzv. izvršnim funkcijama te vizualno-prostornim sposobnostima, ali zato su puno bolji u verbalnoj memoriji u odnosu na bolesnike s AB-om. Upravo zato je za procjenu kognitivnih sposobnosti kod DLB-a bolje koristiti test crtanja sata (CDT, engl. *Clock Drawing Test*), a kod AB-a MMSE test (McKeith i sur., 2004; Knopman i sur., 2003; Mosimann i McKeith, 2003; Ballard i sur., 1999). Psihotični simptomi, koji se prvenstveno odnose na vizualne halucinacije, javljaju se čak kod 80% pacijenata s DLB-om (Mosimann i McKeith, 2003). Kod osoba s ovim oblikom demencije često se javlja i depresija, ali i poremećaj faze spavanja kojeg karakteriziraju brzi pokreti očnih jabučica (REM, engl. *Rapid Eye Movement*). Poremećaj REM faze spavanja prisutan je čak kod polovice pacijenata s DLB-om tako da ga neki stručnjaci smatraju i vrlo važnim dijagnostičkim kriterijem za ovaj oblik demencije (Knopman i sur., 2003). Simptomi parkinsonizma također su često vidljivi u DLB-u, a javljaju se skoro pa istovremeno sa samim simptomima demencije (McKeith i sur., 2004).

Kao i kod ostalih oblika demencije i kod osoba s DLB-om vrlo je važan nefarmakološki pristup kako bi se pomoglo pacijentima i njihovim skrbnicima u boljem razumijevanju i nošenju sa samim simptomima bolesti. U farmakološkom pristupu često se koriste inhibitori kolinesteraza. Za ublažavanje simptoma parkinsonizma nerijetko se koristi levodopa, a za ublažavanje psihotičnih simptoma ovakvim bolesnicima pripisuju se različiti antipsihotici. Pri odabiru terapije treba uvijek paziti na kombinaciju korištenih lijekova, doze te uzeti u obzir omjer rizika i koristi od samog terapijskog pristupa.

1.4. Biomarkeri u dijagnozi demencije

Patološki procesi karakteristični za demencije, posebice za AB, počinju puno prije nego se pojave prvi klinički simptomi bolesti. Tijekom tog pretkliničkog stadija bolesti postepeno dolazi do propadanja neurona, a prvi simptomi se pojavljuju nakon što se prijeđe određeni prag oštećenja. Tu fazu bolesti često se dijagnosticira kao MCI (Simonsen i sur., 2007). U dijagnozi demencije mora se koristiti klinička dijagnoza koja se bazira na medicinskim podacima pacijenta, fizikalnom i neurološkom pregledu, laboratorijskim testovima, neuroslikovnim i neurološkim evaluacijama, u kombinaciji s postmortem histopatološkom analizom moždanog tkiva. Na ovaj način može se s određenom sigurnošću uspostaviti dijagnoza demencije. Trenutačni problem i dalje ostaje kako omogućiti što bolju i sigurniju dijagnozu demencije te razlikovanje između pojedinih tipova demencije. Veliki problem za kliničare predstavlja i otkrivanje neurodegeneracije u što ranijoj fazi, po mogućnosti prije nego što simptomi bolesti postanu vidljivi. U tom pretkliničkom stadiju bolesti bi sigurno i terapijska intervencija mogla dati bolje rezultate, tj. mogla bi značajnije ublažiti te odgoditi pojavu simptoma bolesti.

Jedan od ključnih zadataka istraživača i kliničara je pokušati što više doprinijeti uspostavljanju kriterija za što ranije donošenje pouzdane dijagnoze različitih tipova demencije te dati odgovor na pitanje koliko su postojeći, ali i novo predloženi biljezi, osjetljivi i specifični za indikaciju patoloških promjena živčanih stanica nastalih uslijed demencije. Rana dijagnoza s pouzdanim biomarkerima je temelj za razlikovanje AB-a, MCI-a i drugih oblika demencije (Humpel i Hochstrasser, 2011). Pri prijedlogu novih biomarkera trebalo bi voditi brigu o tome da dobar biomarker treba biti specifičan, dovoljno osjetljiv, prediktivan za tijek bolesti, robustan (omogućuje jednostavno, brzo, točno, ekonomično određivanje kod svih relevantnih vrsta), ne-invazivan i lako dostupan.

1.4.1. Biomarkeri u cerebrospinalnoj tekućini (likvoru)

CST je vrlo važan izvor potencijalnih biomarkera u dijagnozi demencije jer se nalazi u izravnom kontaktu s mozgom i njezin molekularni sastav vjerojatno odražava i biokemijske promjene u mozgu. Problem je što je lumbalna punkcija, kojom se dolazi do uzoraka CST-a, invazivna metoda koja nije bezbolna. Dosada istraživani biomarkeri iz CST-a, koji su se pokazali korisnima u dijagnozi AB-a u ranoj fazi, su A β , ukupni tau (t-tau) i fosforilirani tau (p-tau).

Smanjena koncentracija A β (posebice oblika A β_{40} i A β_{42}) u CST-u kod osoba s AB-om može se detektirati koristeći enzimski povezanu imunoapsorpcijsku analizu (ELISA, engl. *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*). Istraživanja su pokazala da je u ranim i kliničkim fazama bolesti za dijagnozu koristan i sam omjer A β_{42} /A β_{40} (Hansson i sur., 2007). Problem je taj što je smanjena koncentracija A β_{42} pronađena i kod drugih tipova demencije, kao što je FTD (Riemenschneider i sur., 2002b; Sjogren i sur., 2000).

Nova istraživanja predlažu da su topivi oblici A β zapravo toksični i povezani s nastankom AB-a te da ne postoji izravna korelacija između količine senilnih plakova i stupnja demencije. Pretpostavka je da je nastanak senilnih plakova samo posljedica formacije toksičnih i topivih oblika A β , a smanjivanje koncentracije tih oblika u CST-u rezultat nastanka oligomera koji su izrazito toksični (Chong i sur., 2006; Demuro i sur., 2005; Lesne i sur., 2006; White i sur., 2005).

Protein tau sudjeluje u formiranju neurofibrilarnih snopića koji nastaju kao posljedica hiperfosforilacije proteina tau na hidroksilnim skupinama nekih aminokiselina (serin, treonin i prolin) zbog čega dolazi do prelaska topivog oblika ovog proteina, koji je važan u stabilizaciji mikrotubula, u agregirani oblik koji formira unutarstanične filamente (Lau i sur., 2002). Metodom ELISA-e može se detektirati fosforilacija pojedinih epitopa proteina tau (treonin 181, 231 ili serin 235) (Blennow i Hampel, 2003). Koncentracija t-tau u CST-u oboljelih od AB-a je do 300% veća nego kod kontrolnih ispitanika (Blennow i sur., 2001), ali je koncentracija ovog biljega povišena i u nekim drugim patološkim stanjima kao što su VaD i FTD (Blennow, 2004; Formichi i sur., 2006). Detekcija p-tau u CST-u pokazala je jako dobru osjetljivost za razlikovanje AB-a od ostalih oblika demencije (osjetljivost 80%, specifičnost 92%) i za ranu dijagnozu AB-a (Hampel i sur., 2004), tako da je korištenje ovog biomarkera za diskriminaciju između AB-a te normalnog starenja i ostalih demencija puno specifičnije i osjetljivije u odnosu na t-tau i A β . Predloženo je da bi kombinacija biomarkera p-tau i A β ₄₂ mogla dati još bolje rezultate u dijagnostici AB-a nego individualni biomarkeri (Craig-Schapiro i sur., 2009; Maddalena i sur., 2003).

Uz A β i tau kao biomarker u AB-u predložen je još jedan sinaptički protein, visininu sličan protein 1 (VLP-1, engl. *Visinin-Like Protein 1*). Ovo je protein čija je koncentracija povišena u CST-u oboljelih od AB-a u odnosu na kontrolne ispitanike (Lee i sur., 2008) i smatra se da bi ovaj biljeg mogao dodatno doprinijeti preciznosti dijagnoze AB-a u kombinaciji s A β i tau. Sinaptički protein povezan s rastom (GAP-43, engl. *Growth-Associated Protein 43*) također je pronađen u višim koncentracijama kod pacijenata s AB-om u odnosu na kontrole i osobe s FTD-om (Sjogren i sur., 2001). Pokazano je da postoji pozitivna korelacija između GAP-43 i t-tau u CST-u osoba s AB-om (Sjogren i sur., 2001) što upućuje na to da oba proteina odražavaju stupanj aksonalne i sinaptičke degeneracije.

Budući da su oštećenja u AB-u povezana i s nastankom reaktivnih kisikovih vrsta, kao posljedice lipidne peroksidacije u mozgu, postoje indicije da bi se produkti lipidne peroksidacije mogli koristiti kao biomarkeri AB-a. Jedan od predloženih biomarkera iz ove skupine su i F2-izoprostani čija je koncentracija povećana u CST-u oboljelih od AB-a u odnosu na kontrole i ostale oblike demencije (Montine i sur., 1999; Pratico i sur., 1998). Također, kombinacija F2-izoprostana, proteina tau i A β u dijagnozi AB-a pokazala je izrazitu osjetljivost i specifičnost (Montine i sur., 2001).

Zanimljivi potencijalni biomarkeri za korištenje u dijagnozi i praćenju demencije su i ubikvitin te različiti imunološki biljezi. Povišena koncentracija ubikvitina (slobodnog i konjugiranog) pronađena je kod pacijenata s MCI-om kod kojih će doći do progresije u AB (Simonsen i sur., 2007). Od imunoloških biljega do sada su mnogi istraživani kao mogući markeri AB-a, a među njima su i IL-6, transformirajući faktor rasta- β (TGF- β , engl. *Transforming Growth Factor- β*), interferon- α , IL-2, IL-3,

faktor stimulacije rasta kolonija makrofaga (M-CSF, engl. *Macrophage Colony-Stimulating Factor*) i drugi (Mrak i Griffin, 2005). Rezultati vezani za ulogu imunoloških faktora u demenciji su oprečni, vjerojatno zbog genetičke podloge pojedinca, okolišnih faktora, ali i korištenja različitih protuupalnih lijekova (Flirski i Sobow, 2005).

1.4.2. Biomarkeri u plazmi

Plazma je zanimljiva kao izvor biomarkera jer je lako dostupna, a i sama metoda skupljanja i izdvajanja plazme je ekonomski isplativija od dobivanja uzoraka CST-a te je manje invazivna. Upravo zbog izrazite invazivnosti lumbalne punkcije pronalazak perifernih biomarkera demencije veliki je izazov. Mala koncentracija peptida A β i proteina tau u plazmi predstavlja glavnu prepreku za korištenje navedenih markera u dijagnozi AB-a. Istraživanja razine A β u plazmi kod osoba s AB-om dala su oprečne rezultate (Borroni i sur., 2006a; Irizarry, 2004), a postoje i indikacije da razina A β u plazmi ne mora biti u korelaciji s onom u CST-u (Freeman i sur., 2007). No, postoje studije koje pokazuju povezanost razine A β na periferiji i rizika za obolijevanje od AB-a (Graff-Radford i sur., 2007; Pesaresi i sur., 2006). Studija koju su proveli Blasko i suradnici (2008) pokazala je povišenu razinu A β_{42} u ranoj fazi AB-a te je predložila korištenje A β_{42} kao biljega za praćenje prelaska MCI-a u AB. Također, omjer A β_{42} /A β_{40} u plazmi mogao bi se koristiti za identifikaciju osoba koje bi u skoroj budućnosti mogle razviti kognitivne simptome karakteristične za MCI ili AB (Oprisiu i sur., 2006).

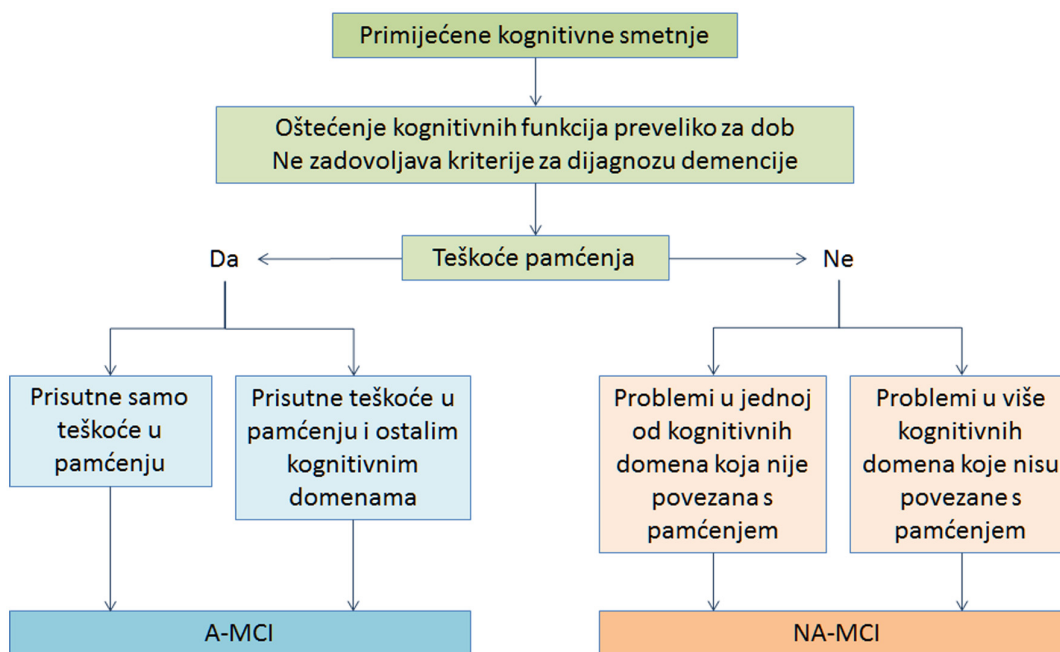
Ostali proteini čija je ekspresija istraživana u svrhe identifikacije novih perifernih biomarkera za AB su: α_2 -makroglobulin (α_2M), faktor H komplementa (CFH, engl. *Complement Factor H*), α_1 -antitripsin, α_1 -antikimotripsin i ApoA1. α_2M i CFH pokazali su povišenu ekspresiju kod pacijenata s AB-om u odnosu na kontrolne ispitanike (Hye i sur., 2006), a slični rezultati su dobiveni i za koncentraciju α_1 -antitripsina (Maes i sur., 2006) i α_1 -antikimotripsina (Lieberman i sur., 1995; Matsubara i sur., 1990) na periferiji. Razina proteina ApoA1 na periferiji smanjena je kod osoba s AB-om u odnosu na zdrave ispitanike (Merched i sur., 2000). No, iako ovi navedeni biljezi očito odražavaju patološke procese prisutne u AB-u, oni nisu dovoljno osjetljivi, specifični i reproducibilni da bi bili prihvaćeni kao biomarkeri.

Od perifernih biomarkera bilo je i prijedloga za korištenje biljega prisutnih u urinu. Jedan od zanimljivih proteina čija se koncentracija u urinu povećava s progresijom demencije je i protein neuralnih niti (NTP, engl. *Neural Thread Protein*) (de la Monte i Wands, 2002; Levy i sur., 2007). Također postoje i istraživanja koja upućuju na povišenu koncentraciju F2-izoprostana u urinu osoba s AB-om (Pratico i sur., 2000; Pratico i sur., 2002; Tuppo i sur., 2001), ali ti rezultati nisu potvrđeni u drugim studijama (Bohnstedt i sur., 2003; Montine i sur., 2000). Prednost urina je njegova dostupnost, a glavni problem u korištenju biomarkera iz urina je njihova vrlo mala koncentracija te visoka koncentracija soli u urinu koja smeta pri analizi (Thongboonkerd, 2007).

1.5. Blagi kognitivni (spoznajni) poremećaj

MCI je klinički entitet koji se definira kao blagi poremećaj kognitivnih funkcija koji ne zadovoljava sve kriterije za dijagnozu demencije. Kod pacijenata s ovim poremećajem zamjećuje se pojava zaboravljivosti, teškoće koncentriranja i slično, ali ih to još uvijek ne ometa previše u svakodnevnim aktivnostima (Petersen i sur., 1999). MCI bi se mogao još definirati kao prijelazno stanje između normalnog starenja i demencije kod kojeg je kognitivni deficit veći od onog kojeg bi očekivali s obzirom na dob pojedinaca. Ovakvi bolesnici zahtijevaju pomnu dijagnostičku obradu i neuropsihološka testiranja s obzirom da je praćenjem takvih bolesnika uočen veliki postotak (50-65%) onih kod kojih se kasnije razvije demencija. Godišnje oko 5 do 10% osoba s MCI-em razvije demenciju (Gauthier i sur., 2006). Upravo povećani stupanj progresije takvih bolesnika u one sa pravom demencijom čini ih idealnom ciljnom skupinom u epidemiološkim, kliničkim i terapijskim studijama (Petersen i sur., 2009).

MCI se može klasificirati u dva klinička podtipa: amnestički oblik MCI-a (A-MCI) i neamnestički tip MCI-a (NA-MCI) (Petersen, 2004) (Slika 7). A-MCI se odnosi na poremećaj kognitivnih sposobnosti kod pojedinaca koji ne zadovoljavaju kriterije za postavljanje dijagnoze demencije.



Slika 7. Dijagnoza kliničkih tipova blagog kognitivnog poremećaja (MCI).

Slika je napravljena prema uzoru na rad Petersen i sur. (2011).

Ovakvi pacijenti su u pravilu svjesni toga da su zaboravni, ali su im ostale kognitivne sposobnosti (kao što su egzekutivne funkcije, govor te vizualno-prostorne sposobnost) dosta dobro očuvane zajedno s funkcioniranjem u svakodnevnim aktivnostima (Petersen, 2004). Ovaj oblik MCI-a vrlo se često razvije u AB. NA-MCI je karakteriziran blagim poremećajem funkcija koje nisu povezane s pamćenjem, kao što su pažnja, govor te vizualno-prostorne funkcije. NA-MCI je rjeđi tip MCI-a i često se smatra pretstadijem demencija koje nisu AB.

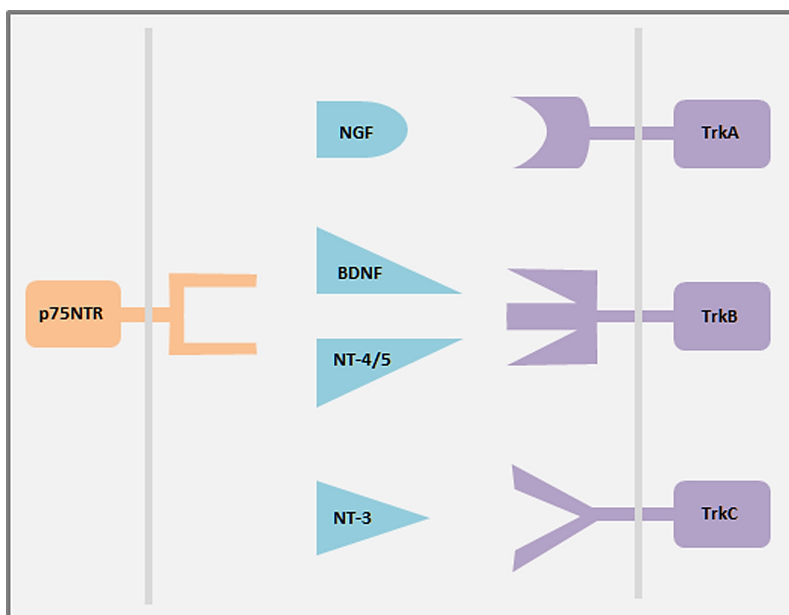
Za kliničare veliki izazov predstavlja razlikovanje simptoma MCI-a od procesa normalnog starenja. Zaboravljivost koja se javlja kod osoba s MCI-em izraženija je nego u slučaju normalnog starenja i vidljivo je polagano pogoršanje u kognitivnim funkcijama s obzirom na prethodno stanje bolesnika. Kognitivno testiranje dio je uspostavljanja dijagnoze MCI-a, a rezultati upućuju na smanjene sposobnosti u jednoj ili više kognitivnih domena u odnosu na očekivano stanje s obzirom na dob i edukaciju pojedinca. Ponekad bolesnici s MCI-em pokazuju i donekle otežano funkcioniranje u svakodnevnim životnim aktivnostima.

Postoje neuroslikovne metode i biomarkeri koji su istraživani u svrhu kako bi olakšali razlikovanje onih osoba s MCI-em koje imaju povećani rizik za progresiju u demenciju (Jack i sur., 2008), no još uvijek nema biljega koji se u tu svrhu koriste u rutinskoj kliničkoj praksi. Jedna od dobro istraživanih metoda pristupa u predikciji progresije MCI-a je MRI (Apostolova i sur., 2006; Jack i sur., 2008). Funkcionalne neuroslikovne tehnike, kao što je i ^{18}F -fluorodeoksiglukoza (^{18}F FDG)-PET, također su pokazale dobre rezultate vezane za otkrivanje predispozicije za progresiju prema AB-u kod osoba s MCI-em (Chetelat i sur., 2003; Drzezga i sur., 2005; Landau i sur., 2010). CST biomarkeri, koji su najviše istraživani u ovu svrhu, su $\text{A}\beta_{42}$ i protein tau. Studije su pokazale da osobe s MCI-em, koje su imale smanjenu koncentraciju $\text{A}\beta_{42}$ i povišenu koncentraciju proteina tau u CST-u, imaju i veći rizik od progresije prema AB-u (Shaw i sur., 2009). Slično je pokazano i za smanjeni omjer $\text{A}\beta_{42}$ prema tau u CST-u (Hansson i sur., 2006). Problem je u velikoj varijabilnosti vrijednosti ovih biomarkera između pojedinih laboratorija tako da će biti potrebno provesti standardizaciju metoda prije bilo kakve rutinske kliničke primjene.

Trenutačno ne postoje specijalizirani lijekovi za terapiju MCI-a, a korištenje lijekova koji su inače prisutni u terapiji AB-a nije se pokazalo uspješnim (Simon i sur., 2012). Problem u terapiji sigurno predstavlja i velika heterogenost unutar dijagnoze MCI-a zbog čega se sve veća pažnja polako poklanja nefarmakološkim pristupima u terapiji.

1.6. Moždani neurotrofni čimbenik

BDNF je član porodice neurotrofina, proteina koji su vrlo važni regulatori preživljenja, razvoja i funkcije neurona, a imaju i ključnu ulogu u embriogenezi i organogenezi te u regulaciji sinaptičke aktivnosti, sinteze neurotransmitera i sinaptičke plastičnosti kod odraslih osoba (McAllister i sur., 1999; Reichardt i Farinas, 1997; Sofroniew i sur., 2001). BDNF je jedan od 6 proteina unutar porodice neurotrofina kojima pripadaju još i čimbenik rasta živaca (NGF, engl. *Nerve Growth Factor*), neurotrofin (NT)-3 (NT-3), NT-4/5, NT-6 i NT-7, s tim da NT-6 i NT-7 nisu pronađeni kod sisavaca (Gotz i sur., 1994; Nilsson i sur., 1998). Svi članovi porodice neurotrofina imaju sličnu strukturu, a dolaze u interakciju s dva tipa receptora: porodicom tropomiozin-receptor-kinaza (Trk) i pan neurotrofinskim receptorom (p75NTR). Neurotrofini imaju svoje preferirane receptore Trk (Slika 8), ali se mogu vezati i na p75NTR aktivirajući druge signalne puteve.



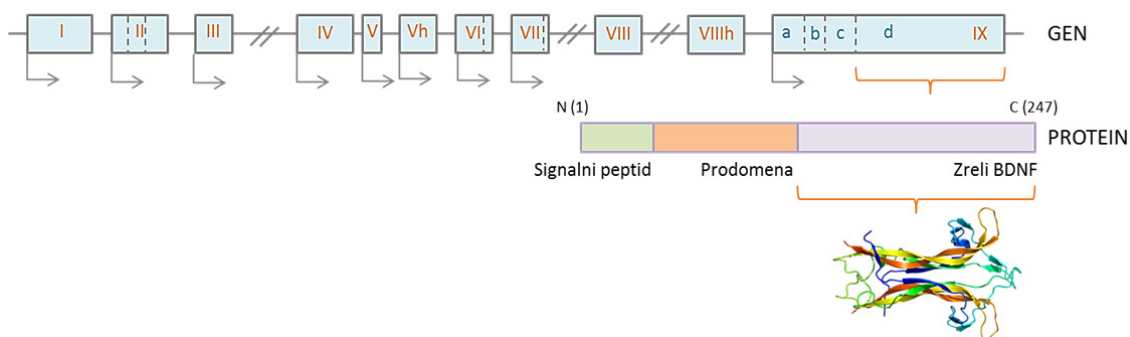
Slika 8. Članovi porodice neurotrofina

Kratice: BDNF, moždani neurotrofni čimbenik; NGF, čimbenik rasta živaca; NT, neurotrofin; p75NTR, pan neurotrofinski receptor; Trk, tropomiozin-receptor-kinaza.

Neurotrofini se sintetiziraju kao nezreli oblik proteina (pro-neurotrofin) iz kojeg proteolitičkim odcjepljivanjem prodomene nastaje zreli protein (m-neurotrofin). Pro-neurotrofini imaju suprotno djelovanje u odnosu na zrele oblike istih, tj. promoviraju apoptozu putem receptora p75NTR.

Gen koji kodira za protein BDNF smješten je na 11. kromosomu, sadrži 11 eksona (Slika 9), a pruža se u duljini od oko 70kb (Pruunsild i sur., 2007). Transkripcija gena BDNF može započeti s 9 različitih promotora (Slika 9) koji, u kombinaciji s procesom alternativnog prekrajanja introna, daju 34 do sada poznata transkripta koji se eksprimiraju različito u odgovoru na razne podražaje (Baj i Tongiorgi, 2009).

Svi navedeni transkripti ovog gena daju isti proteinski produkt koji je kodiran dijelom eksona IX. Većina do danas poznatih transkripata gena BDNF eksprimirana je u moždanom tkivu, no pokazano je da postoji ekspresija određenih transkripata ovog gena i u perifernim tkivima kao što su srce, posteljica, prostata, testisi, pluća, bubrezi, jetra, itd. (Pruunsild i sur., 2007). Transkripti koji sadrže eksona II, III, IV, V i VII u pravilu su specifični za moždano tkivo, dok su transkripti s eksonom VI i IX prisutni u većini tkiva i organa (Pruunsild i sur., 2007). Pruunsild sa suradnicima (2007) pokazao je da postoji i nekodirajuća antisense RNA koja se prepisuje s lokusa gena BDNF (antiBDNF). Ovaj gen antiBDNF ima najmanje 10 eksona i bar jedan funkcionalni promotor uzvodno od prvog eksona (Pruunsild i sur., 2007).



Slika 9. Organizacija gena za moždani neurotrofni čimbenik (BDNF) i njegovog produkta.

Strelice označavaju mjesta početka transkripcije, a iscrtane linije mjesta alternativnog prekranjanja eksona.

BDNF djelovanjem putem svoje receptorske kinaze TrkB aktivira različite signalne puteve i utječe na rast i razvoj neurona, regeneraciju i degeneraciju, sinaptičku plastičnost, neurotransmisiju posredovanu različitim neurotransmiterima, kogniciju, učenje i pamćenje.

1.6.1. Sinteza, otpuštanje i signalni putevi moždanog neurotrofnog čimbenika

Kao i svaki neurotrofin, tako se i BDNF sintetizira kao prekursorski protein sa signalnom N-terminalnom sekvencom (pre-proBDNF) pomoću koje ulazi u ER (Slika 10). Nakon odcjepljenja signalnog peptida unutar ER-a, protein proBDNF dalje putuje u GA te trans-Golgijevu mrežu (TGN, engl. *Trans-Golgi Network*) gdje se dodatno dorađuje i pakira u sekrecijske vezikule (Slika 10). Unutar GA proBDNF i mBDNF dodatno se i post-translacijski modificiraju, a vezikule koje sadrže BDNF (proBDNF i mBDNF) otpuštaju se i putuju prema određenim unutarstaničnim odjeljcima.

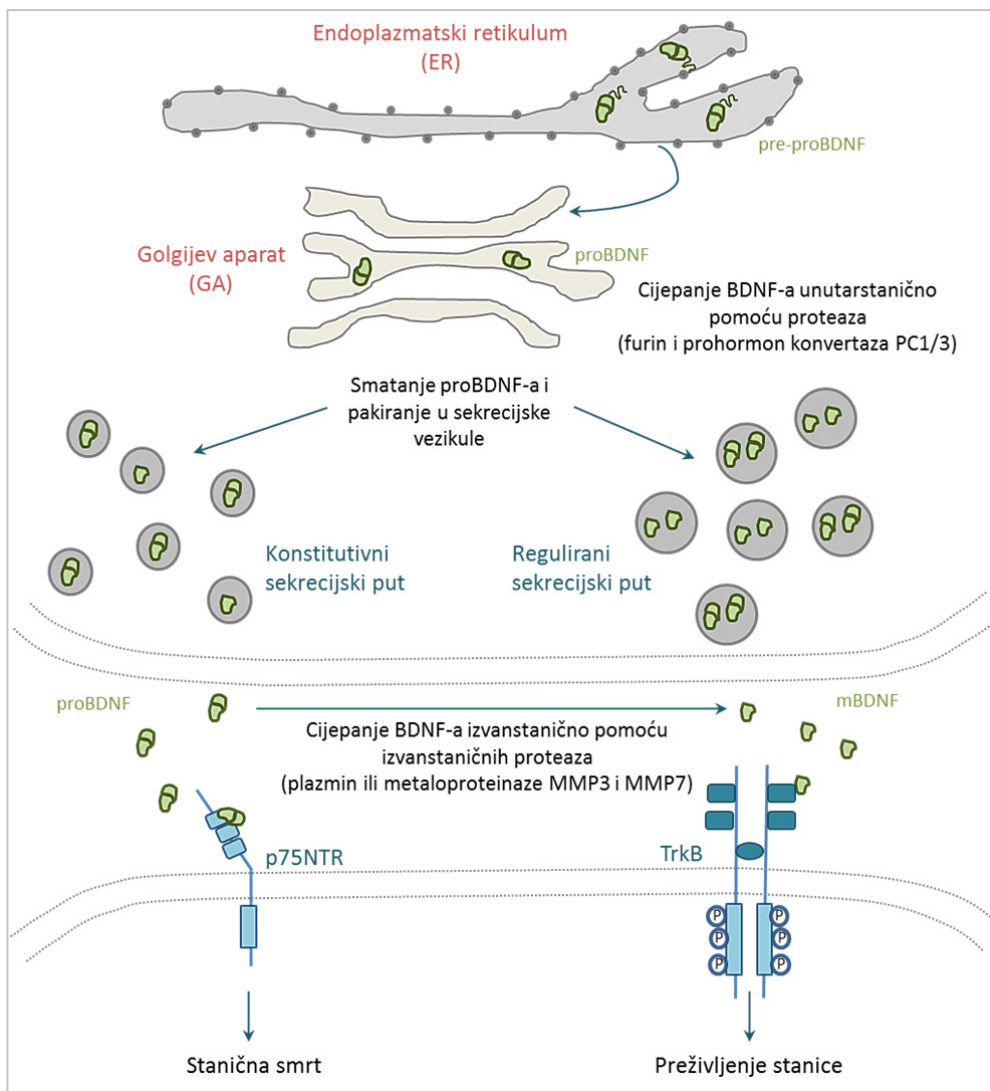
Pohranjeni BDNF može se otpuštati iz presinaptičkih i postsinaptičkih struktura (Kohara i sur., 2001; Kojima i sur., 2001; Lessmann i sur., 2003) na dva načina (Slika 10):

- konstitutivnim sekrecijskim putem (koristeći vezikule koje bez dodatnog poticaja otpuštaju svoj sadržaj kada dođu u doticaj s membranom stanice),
- reguliranim sekrecijskim putem, tj. kao reakcija na određeni podražaj (regulirano otpuštanje putem Ca^{2+} -ovisne egzocitoze sekretornih granula).

Većina BDNF-a ipak se izlučuje u regulirane sekrecijske puteve, a manji dio se izlučuje konstitutivno.

Samo odcjepljivanje pro-domene BDNF-a može se dogoditi na raznim lokacijama unutar stanice duž oba sekrecijska puta, ali i izvan stanice djelovanjem izvanstaničnih proteaza (Slika 10).

Prijenos BDNF-a u dendritima i njegova sinaptička lokalizacija ovise o prodomeni ovog proteina. Poznato je da polimorfizam jednog nukleotida (SNP, engl. *Single Nucleotide Polymorphism*) rs6265 (Val66Met), koji se nalazi u kodonu 66, a rezultira zamjenom aminokiseline valin (Val) aminokiselinom metionin (Met), utječe na transport BDNF-a u dendritima (Egan i sur., 2003). Za reguliranu sekreciju proteina BDNF vrlo je važna njegova interakcija s receptorom sortilinom u sekrecijskim zrcima, a u toj interakciji ključnu ulogu ima prodomena proteina BDNF (Chen i sur., 2005). Varijanta proBDNF-a koja u kodonu 66 ima aminokiselinu Met ima i slabiju sekreciju upravo zbog oslabljene interakcije sa sortilinom (Chen i sur., 2005). Također, prisustvo samo jednog alela Met kod pojedinaca za posljedicu ima manje efikasno sortiranjem BDNF-a u različite sekretorne puteve jer varijanta Met proteina BDNF tvori heterodimere s varijantom Val i na taj način mijenja transport divljeg tipa proteina BDNF (Chen i sur., 2004). Zanimljivo je da je upravo sortilin ključan koreceptor za pro-apoptičko signaliziranje proBDNF-a putem p75NTR (Teng i sur., 2005) i da A β djelujući preko p75NTR može povećati ekspresiju sortilina (Saadipour i sur., 2013).



Slika 10. Sinteza i sekrecija moždanog neurotrofnog čimbenika.

Kratice: BDNF, moždani neurotrofni čimbenik; p75NTR, pan neurotrofinski receptor; Trk, tropomiozin-receptor-kinaza.

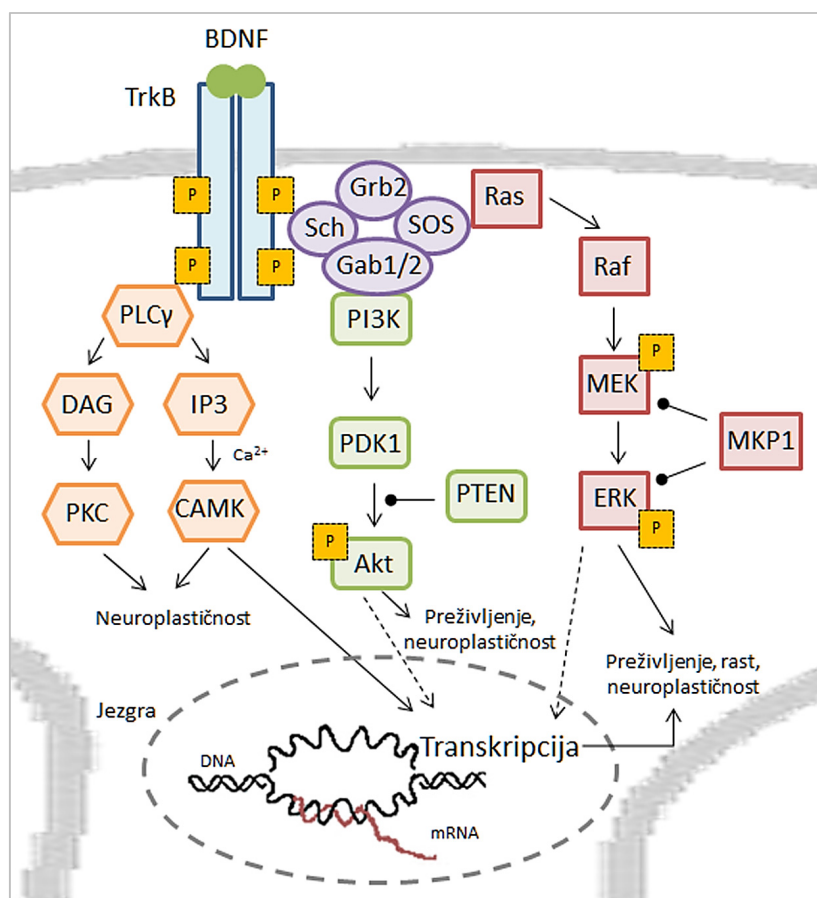
Zreli BDNF (mBDNF) nakon izlučivanja iz stanice veže se na TrkB i potiče dimerizaciju i autofosforilaciju ovog receptora te time aktivira nizvodno više signalnih puteva.

Signalni putevi kojima BDNF ostvaruje svoje djelovanje unutar stanica su (Slika 11):

- put izvanstaničnim signalom regulirane kinaze (ERK) (koja je član obitelji mitogenom-aktiviranih proteinskih kinaza, MAPK),
- put fosfatidilinozitol 3-kinaze (PI3K),
- signalni put fosfolipaze C gama (PLC γ).

Signalizacija putem TrkB može potaknuti otpuštanje gvanozin-difosfata (GDP) i vezivanje gvanozin-trifosfata (GTP) na protein Ras, koji pripada porodici GTP-aza i uključen je u prijenos signala unutar

stanice. Ras zatim aktivira nizvodne kinaze, uključujući i MAPK/ERK (Slika 11) koja onda utječe na transkripciju aktivirajući različite transkripcijske faktore (Shaywitz i Greenberg, 1999). Protein Ras sudjeluje i u aktivaciji PI3K signalnog puta (Reichardt, 2006) koji završava aktivacijom kinaze Akt (protein-kinaza B) (Slika 11), enzima koji je važan u procesima translacije proteina i preživljavanju stanica. TrkB-PI3K-Akt signalni put aktivira translaciju putem proteina koji je meta rapamicina kod sisavaca (mTOR, engl. *Mammalian Target Of Rapamycin*) (Sarbassov i sur., 2005). Enzim PLC γ nakon aktivacije djeluje tako da hidrolizira fosfatidil-inozitol-4,5-bifosfat (PIP $_2$) pri čemu kao produkti nastaju diacilglicerol (DAG) i inozitol-1,4,5-trifosfat (IP $_3$) (Huang i Reichardt, 2003; Reichardt, 2006) (Slika 11). DAG zatim nizvodno aktivira protein-kinazu C (PKC), a IP $_3$ potiče otpuštanje Ca $^{2+}$ iz unutarstaničnih skladišta (ER). Ovaj signalni put također regulira i transport sinaptičkih proteina (Yoshii i Constantine-Paton, 2007).



Slika 11. Signalizacija moždanog neurotrofnog čimbenika putem tropomiozin-receptor-kinaze B.

Kratice: Akt, serin treonin kinaza; BDNF, moždani neurotrofni čimbenik; CAMK, Ca $^{2+}$ /calmodulin-ovisna protein kinaza; DAG, diacilglicerol; ERK, izvanstaničnim signalom regulirana kinaza; Gab1/2, protein koji se veže na Grb2; Grb2, za receptor čimbenika rasta vezani protein 2; MEK, MAPK/ERK kinaza; MKP1, fosfataza 1 MAP kinaze; PDK1, fosfatidilinozitol 3-ovisna protein kinaza 1; PI3K, fosfatidilinozitol 3-kinazna; PKC, protein kinaza C; PLC γ , fosfolipaze C gama; PTEN, homolog fosfataze i tenzina; Sch, adaptor protein koji sadrži Src homolognu 2 domenu; SOS, engl. *son of sevenless*; TrkB, trpomiozin-receptor-kinaza B.

Postoje dokazi koji upućuju na to da je signalni put BDNF-TrkB važan u regulaciji gustoće dendritičkih trnova (Shimada i sur., 1998; Tyler i Pozzo-Miller, 2003). Jedan od mogućih mehanizama kojima bi BDNF mogao utjecati na stabilizaciju i maturaciju sinapsi je djelovanjem putem konstrukcijskog proteina koji regulira postsinaptičku gustoću (PSD-95, engl. *Postsynaptic Density-95 scaffolding protein*) (Hu i sur., 2011).

Nezreli protein (proBDNF) veže se na receptor p75NTR i aktivira više signalnih molekula među kojima su i jezgrin faktor κ B (NF- κ B, engl. *Nuclear Factor κ B*), c-Jun N-terminalna kinaza (JNK) te RhoA (protein koji veže gvanozin-trifosfat). p75NTR negativno modulira morfologiju dendrita i gustoću dendritičkih trnova (Zagrebelsky i sur., 2005).

1.6.2. Uloga moždanog neurotrofnog čimbenika u učenju i pamćenju

Protein BDNF je ključan faktor u rastu aksona, modulaciji rasta i morfologije dendrita te u regulaciji preživljenja i diferencijacije pojedinih populacija neurona u središnjem i perifernom živčanom sustavu tijekom razvoja organizma (Bibel i Barde, 2000; Binder i Scharfman, 2004). Kod odraslih organizama BDNF preuzima važnu ulogu u regulaciji sinaptičke transmisije i plastičnosti.

Mozak kod sisavaca zadržava trajnu sposobnost mijenjanja, tj. prilagodbe na vanjske utjecaje i različita iskustva. Ovu sposobnost omogućuje mehanizam sinaptičke plastičnosti koji je ključan u procesima učenja i pamćenja. Kod sisavaca jačina sinapsi u mozgu je promjenjiva, što znači da ovisno o potrebi pojedine sinapse mogu jačati, a druge slabiti. Proces dugoročnog povećanja jačine prijenosa signala između dva neurona, tj. proces dugoročnog potenciranja (LTP, engl. *Long-Term Potentiation*) (Schinder i Poo, 2000; Schuman, 1999), koji se također smatra staničnim ekvivalentom učenja i memorije, ovisan je o djelovanju BDNF-a. U LTP-u je ključna presinaptička uloga proteina BDNF koji povećava broj sekrecijskih vezikula, olakšava njihovo usidranje i fuziju s membranom (Tyler i Pozzo-Miller, 2003) te na taj način inducira dugotrajne strukturne promjene u dendritičkim trnovima koji tvore sinapse sa susjednim neuronima (Tanaka i sur., 2008). No, u mehanizmu LTP-a ulogu ima i postsinaptičko signaliziranje putem proteina BDNF. Poznato je da LTP može inducirati ekspresiju gena pomoću PI3K-Akt-mTOR i MAPK/ERK signalnog puta (Klann i Dever, 2004). Predloženi mehanizam ranog i kasnog LTP-a (Yoshii i Constantine-Paton, 2010) započinje s ulaskom većih količina Ca^{2+} iona u neuron djelovanjem NMDA receptora i Ca^{2+} kanala L-tipa (Grover i Teyler, 1990) te djelovanjem BDNF-TrkB signaliziranja putem signalnog puta PLC γ . Presinaptičko djelovanje PLC γ rezultira vezivanjem većeg broja vezikula i otpuštanjem glutamata u sinapsu (Yoshii i Constantine-Paton, 2007). Daljnja kasna faza LTP-a ovisi o sintezi proteina putem signalnog puta PI3K te o aktivaciji MAPK i transkripcijskog faktora CREB. Aktivacija BDNF-a također povećava i dotok PSD-95 u sinapsu.

Postoje indikacije da BDNF regulira i dugoročnu depresiju (LTD, engl. *Long-Term Depression*). LTD je mehanizam kojim se smanjuje snaga sinapse, a javlja se kao posljedica ne korištenja, tj. slabijeg korištenja pojedinih sinaptičkih veza tijekom duljeg vremenskog perioda. Djelovanje nepocijepanog

proBDNF-a preko receptora p75NTR pojačava LTD koja je ovisna o receptorima NMDA (Woo i sur., 2005). Očito je da je BDNF vrlo važan neurotrofin s ključnom ulogom u sinaptičkoj plastičnosti u različitim regijama SŽS-a u odrasloj dobi, ali i tijekom procesa starenja.

Ulogu BDNF-a u učenju i memoriji potvrđuju i istraživanja na glodavcima koja upućuju na povećanu ekspresiju glasničke ribonukleinske kiseline (mRNA, engl. *messenger RNA*) koja kodira za BDNF u hipokampusu nakon kontekstualnog kondicioniranja strahom (Hall i sur., 2000) te nakon izlaganja Morrisovom vodenom labirintu (Kesslak i sur., 1998). Nakon kondicioniranja strahom pokazano je da kod životinja dolazi do povećanja razine mRNA koja kodira za protein BDNF, ali i razine samog proteina BDNF te do povećane fosforilacije receptora TrkB u području amigdale (Rattiner i sur., 2004). BDNF je najviše eksprimiran u područjima mozga kao što su hipokampus, neokorteks, strijatum, amigdala i mali mozak (Dugich-Djordjevic i sur., 1995; Kawamoto i sur., 1996), tj. u područjima mozga koja su odgovorna za kognitivne funkcije. Upravo uloga koju BDNF ima u nastanku memorije i njezinoj pohrani, upućuje na potencijalno vrlo važno djelovanje ovog neurotrofina u mehanizmima koji dovode do razvoja neurodegenerativnih bolesti poput AB-a.

1.6.3. Moždani neurotrofni čimbenik u Alzheimerovoj bolesti

AB je progresivni neurodegenerativni poremećaj koji je na početku karakteriziran blagim kognitivnim oštećenjem, dok ga u kasnijim fazama bolesti karakterizira slabljenje višestrukih kortikalnih funkcija. U mozgu bolesnika koji boluju od AB-a uočavaju se mnogobrojni senilni plakovi i neurofibrilarna degeneracija, koja se javlja kao posljedica akumulacije hiperfosforiliranog proteina tau i nastanka neurofibrilarnih snopića u neuronima i glija stanicama. Ove neuropatološke promjene popraćene su smanjenim transportom u aksonima te propadanjem neurona.

BDNF je eksprimiran i široko rasprostranjen u mozgu, za razliku od nekih drugih neurotrofina, a njegova funkcija je ključna za preživljavanje i plastičnost neurona diljem moždanog tkiva, posebice neurona u onim regijama mozga koje su ozbiljno oštećene u AB-u (neuroni hipokampusu, kortikalni i kolinergički neuroni) (Ghosh i sur., 1994; Knusel i sur., 1991; Lindholm i sur., 1996). Istraživanja in vitro te istraživanja na animalnim modelima, pokazala su ključnu ulogu ovog neurotrofina u diferencijaciji i preživljavanju neurona, sinaptičkoj plastičnosti i kogniciji (Bartkowska i sur., 2010; Massa i sur., 2010; Minichiello i sur., 1999; Yamada i sur., 2002). Murer je sa suradnicima (1999) pokazao da u moždanom tkivu osoba s AB-om, točnije u neuronima koji su sadržavali neurofibrilarne snopiće, nije bilo proteina BDNF, dok su neuroni sa snopićima bili izrazito bogati ovim neurotrofinom. Uloga proteina BDNF u AB-u povezuje se i s njegovim važnim modulatornim učinkom u neurotransmisiji. Poznato je da kolinergički neuroni u prednjem mozgu propadaju tijekom AB-a, a BDNF je važan jer promovira preživljenje i diferencijaciju ovih neurona (Garzon i sur., 2002). U kolinergičkim neuronima BDNF potiče i otpuštanje Ach, neurotransmitora koji je deficitaran kod pacijenata s AB-om (Knipper i sur., 1994). Kod osoba koje boluju od AB-a također dolazi i do propadanja serotonergičkih neurona. BDNF i 5-HT sustav međusobno su povezani tako da promjene

u razini proteina BDNF mogu uzrokovati modifikacije 5-HT sustava i na taj način pridonijeti neurodegeneraciji (Mattson i sur., 2004).

Uloga BDNF-a u demenciji ovisi o njegovoj signalizaciji putem receptora TrkB. Kod AB-a je pokazana smanjena signalizacija BDNF-a putem receptora TrkB (Connor i sur., 1997; Garzon i sur., 2002; Holsinger i sur., 2000; Michalski i Fahnstock, 2003; Peng i sur., 2005). No ova signalizacija izrazito ovisi i o promjenama u alternativnoj ekspresiji transkripata gena za TrkB. Tako je pokazano da je u hipokampusu te frontalnom i temporalnom korteksu osoba s AB-om smanjena prisutnost neurona koji ekspimiraju dulji, funkcionalni oblik receptora TrkB, dok je ekspresija skraćenog oblika ovog receptora povezana s nastankom senilnih plakova (Allen i sur., 1999; Ferrer i sur., 1999).

Elliott sa suradnicima (2005) pokazao je da stimulacija stanične kulture neurona P19 neurotrofinom BDNF dovodi do smanjene fosforilacije proteina tau. P19 stanice dobivaju se iz pluripotentnih stanica teratokarcinoma miša. Ovi rezultati predlažu korelaciju između smanjene razine BDNF-a i AB patologije koja se odnosi na tau hiperfosforilaciju (Elliott i sur., 2005). BDNF je povezan i sa sintezom kolesterola u neuronima i to na način da potiče biosintezu kolesterola i njegovu lokalizaciju u tzv. lipidne splavi (engl. *rafts*) (Suzuki i sur., 2007). BDNF s AB patologijom povezuje i činjenica da blokiranjem BDNF signalizacije, koristeći protutijela za protein BDNF, dolazi do prekomjernog nastanka A β i njegove akumulacije u neuronima (Matrone i sur., 2008).

Daljnja istraživanja trebala bi se usmjeriti na detaljnije istraživanje uloge signalizacije BDNF-TrkB u demenciji, kako bi se razjasnilo kada dolazi do promjena u ovom signalizacijskom mehanizmu, u kojim fazama bolesti, te koja je korelacija ovih promjena s uočenim neuropatološkim promjenama kod dementnih bolesnika.

1.6.3.1. Ekspresija moždanog neurotrofnog čimbenika i Alzheimerova bolest

Mnoga istraživanja ekspresije proteina BDNF u mozgu oboljelih od AB-a pokazala su da postoji smanjena ekspresija ovog neurotrofina kod osoba s AB-om u odnosu na kontrolne ispitanike (Fahnestock i sur., 2002; Ferrer i sur., 1999; Hock i sur., 2000; Holsinger i sur., 2000). Pokazano je da je i količina prekursorske forme proBDNF, zrelog oblika proteina (Michalski i Fahnestock, 2003; Peng i sur., 2005) te njegove mRNA (Holsinger i sur., 2000) smanjena u parijetalnom korteksu i hipokampusu osoba koje su umrle od AB-a. No, postoje i postmortem studije koje su pokazale povišenu koncentraciju proteina BDNF i njegovog receptora TrkB u hipokampusu i parijetalnom korteksu pacijenata s AB-om (Durany i sur., 2000; Savaskan i sur., 2000). Problem postmortem studija predstavlja vremenski period koji prođe od smrti osobe do uzorkovanja i analize. U obzir treba uzeti i činjenicu da oboljeli od AB-a imaju smanjenu gustoću neurona, smanjeni broj dendrita i sinapsi, što sve može utjecati na rezultate ovakvih istraživanja. Također treba imati na umu da kod analiza napravljenih koristeći metodu ELISA treba odabrati dobar test koji će maksimalno specifično detektirati ili proBDNF ili mBDNF.

Dosadašnja istraživanja upućuju na potencijalnu ulogu BDNF-a kao biomarkera za što raniju dijagnozu i praćenje učinkovitosti terapije te tijeka bolesti kod pacijenata s AB-om. Korištenje proteina BDNF koji se nalazi na periferiji u svrhu biomarkera podržava činjenica da BDNF može prijeći krvno-moždanu barijeru (Pan i sur., 1998a; Pan i sur., 1998b). Studije koje pokazuju da postoji sličan profil promjene količine ovog neurotrofina na periferiji i u mozgu tijekom postnatalnog razvoja, ali i dokazana korelacija između razine serumskog i kortikalnog proteina BDNF (Karege i sur., 2002), također dodatno opravdavaju istraživanja BDNF-a u svrhu otkrivanja novog perifernog i lako dostupnog biljega u demenciji.

1.6.3.2. Polimorfizmi gena za moždani neurotrofni čimbenik i Alzheimerova bolest

Međunarodna genetička baza podataka AlzGene, koja je dostupna na internetskoj stranici: www.alzgene.org, prikazuje sve gene koji su do sada istraživani u korelaciji s AB-om (Bertram i sur., 2009). Unutar ove baze navedene su i ukupno 34 studije, provedene na različitim etničkim skupinama, o povezanosti polimorfizama gena BDNF i AB-a (Tablica 2). U literaturi su uglavnom prisutni vrlo različiti i konfliktni podaci koji se najviše odnose na moguću povezanost ili nedostatak povezanost između genetičkih varijanti dva najčešće istraživana polimorfizma gena BDNF, Val66Met (rs6265) i C270T (rs56164415) s AB-om.

Polimorfizam rs6265 Val66Met gena za BDNF je funkcionalni i najčešće istraživani polimorfizam ovog gena. Alel Met polimorfizma rs6265 povezan je s različitim neuropsihijatrijskim poremećajima (Momose i sur., 2002; Neves-Pereira i sur., 2002; Sen i sur., 2003; Sklar i sur., 2002; Ventriglia i sur., 2002). Također, pokazano je i da heterozigoti za ovaj polimorfizam imaju određene probleme s pamćenjem (Egan i sur., 2003; Hariri i sur., 2003; Rybakowski i sur., 2003). Istraživanja polimorfizma

C270T gena BDNF, koji se također često povezuje s pojavom AB-a, dala su niz oprečnih, pozitivnih i negativnih rezultata. Polimorfizam C270T smješten je u nekodirajućoj regiji eksona V gena za BDNF te bi mogao biti povezan s ekspresijom gena BDNF (Huang i sur., 2007). Ovaj polimorfizam nalazi se zapravo na poziciji 132 unutar eksona V (Itoh i sur., 2005) pa bi točnija oznaka za ovaj polimorfizam bila C132T, ali je u literaturi uvriježen naziv C270T kojeg je dao Kunugi sa suradnicima (2001) i koji je ovaj polimorfizam povezao s razvojem AB-a s kasnim početkom. Kunugi sa suradnicima (2001) pretpostavio je da bi vidljivi učinak alela T polimorfizma C270T na razvoj AB-a s kasnim početkom mogao biti posljedica djelovanja ovog polimorfizma na učinkovitost translacije ili bi uočeni učinak mogao biti posljedica nekog drugog polimorfizma koji se nalazi u tzv. neravnoteži udruživanja alela (LD, engl. *Linkage Disequilibrium*) s C270T. Moglo bi se reći da su uloga polimorfizma C270T i njegova funkcija još uvijek nedovoljno istražene.

Drugi polimorfizmi gena BDNF (rs1048220, rs1048221, rs8192466) nisu bili značajno povezani s pojavom AB-a, dok je za samo jedan SNP (rs1048218) pronađen trend prema povezanosti s pojavom AB-a s kasnim početkom (Cozza i sur., 2008). Različiti polimorfizmi (rs2030324; rs2049045, rs2203877, SNP5) gena za BDNF i njegov receptor TrkB, kao i njihove haplotipske kombinacije, nisu bili značajno povezani s nastankom AB kod osoba finskog porijekla (Vepsalainen i sur., 2005). Huang i suradnici (Huang i sur., 2007) istraživali su 11 polimorfizama na kromosomu 11p14 kod bolesnika s AB-om i pronašli su da su heterozigoti za polimorfizam Val66Met, kao i kombinacije određenih haplotipova (Val66Met, rs11030104, rs2049045; H1-GTC/H2-ACG) značajno povezani s pojavom AB-a.

Napravljena je velika meta-analiza svih polimorfizama u ukupno 27 gena, uključujući i BDNF, koristeći podatke pohranjene u AlzGene bazi (Schjeide i sur., 2009). Pokazano je da su polimorfizmi gena BDNF značajno povezani s pojavom AB-a u obiteljskim studijama, u koje je uključeno preko 4000 ispitanika iz različitih centara, međutim ta se značajna povezanost gubi radi korekcije na višestruko testiranje (Schjeide i sur., 2009).

Tablica 2. Polimorfizmi gena za moždani neurotrofni čimbenik u Alzheimerovoj bolesti.

Referenca	Polimorfizam	Populacija	Broj ispitanika		p
			AB	K	
Akatsu i sur. (2006)	rs6265 (Val66Met) rs56164415 (C270T)	Japan	95	108	N
Bagnoli i sur. (2004)	rs6265 (Val66Met) rs56164415 (C270T)	Italija	128	97	N
Bian i sur. (2005)	rs6265 (Val66Met)	Kina	203	239	P
Bodner i sur. (2005)	rs6265 (Val66Met) rs56164415 (C270T) rs7103411	SAD	256	194	N
Combarros i sur. (2004)	rs6265 (Val66Met)	Španjolska	237	218	N
Cousin i sur. (2011)	rs56164415 (C270T)	Francuska	428	475	
Cozza i sur. (2008)	rs6265 (Val66Met) rs56164415 (C270T) rs1048218 rs1048220 rs1048221 rs8192466	Italija	251	97	T
Desai i sur. (2005)	rs6265 (Val66Met) rs56164415 (C270T)	SAD	995	671	N
Desai i sur. (2006)	rs6265 (Val66Met) rs56164415 (C270T)	SAD (Afričko podrijetlo)	65	45	N
Feher i sur. (2009)	rs6265 (Val66Met)	Mađarska	160	164	P
Forero i sur. (2006a)	rs6265 (Val66Met)	Kolumbija	102	168	T
Fukumoto i sur. (2010)	rs6265 (Val66Met) rs56164415 (C270T)	Japan	657	525	P
Giedraitis i sur. (2009)	rs6265 (Val66Met) rs11030104 rs2049046	Švedska	86	404	N
Grunblatt i sur. (2009)	rs56164415 (C270T)	Austrija	127	479	N
He i sur. (2007)	rs6265 (Val66Met)	Kina	513	575	N
Huang i sur. (2007)	rs6265 (Val66Met) rs56164415 (C270T) rs11030105 rs2049047 rs2049045 rs7124442 rs11030121	SAD	220	128	P

AB, Alzheimerova bolest; K, kontrolna skupina, N, neznačajan rezultat; P, značajan (pozitivan) rezultat; T, trend

Tablica 2. ...nastavak

Referenca	Polimorfizam	Populacija	Broj ispitanika		p
			AB	K	
Kunugi i sur. (2001)	rs56164415 (C270T)	Japan	170	499	P
Lee i sur. (2005)	rs6265 (Val66Met) rs56164415 (C270T)	SAD	116	77	N
Li i sur. (2005)	rs6265 (Val66Met)	SAD (UCSD)	188	361	N
		SAD (WashU)	388	349	N
		UK	359	396	N
Li i sur. (2008)	rs6265 (Val66Met) rs11030106	Kanada	753	736	N
Matsushita i sur. (2005)	rs6265 (Val66Met) rs56164415 (C270T)	Japan	487	471	P
Nacmias i sur. (2004)	rs6265 (Val66Met)	Italija	83	97	N
Nishimura i sur. (2004)	rs56164415 (C270T)	Brazil	188	188	N
Nishimura i sur. (2005)	rs6265 (Val66Met) rs56164415 (C270T)	Japan	172	275	P
Olin i sur. (2005)	rs56164415 (C270T)	SAD	212	202	P
Reiman i sur. (2007)	rs6265 (Val66Met) rs11030107	SAD, Nizozemska	861	550	N
Riemenschneider i sur. (2002a)	rs56164415 (C270T)	Njemačka	201	188	P
Saarela i sur. (2006)	rs6265 (Val66Met) rs56164415 (C270T)	Finska	97	101	N
Schjeide i sur. (2009) (obiteljska studija)	rs6265 (Val66Met)	SAD (CAG)	222	267	N
		SAD (NCRAD)	741	300	P
		SAD (NIA)	803	290	N
		SAD (NIMH)	995	411	N
Tsai i sur. (2004)	rs6265 (Val66Met)	Kina			N
Tsai i sur. (2006)	rs6265 (Val66Met) rs56164415 (C270T)	Kina	175	189	P
Ventriglia i sur. (2002)	rs6265 (Val66Met) rs6265 (Val66Met) rs2049046	Italija	130	111	P
Vepsalainen i sur. (2005)	rs2030324 rs2203977 SNP5	Finska	375	460	N
Webster i sur. (2010)	rs6265 (Val66Met)	SAD, Nizozemska	861	550	N
Zhang i sur. (2006)	rs6265 (Val66Met) rs56164415 (C270T) G-712A	SAD	295	250	N

AB, Alzheimerova bolest; K, kontrolna skupina, N, neznačajan rezultat; P, značajan (pozitivan) rezultat; T, trend

1.6.3.3. Moždani neurotrofni čimbenik u terapiji Alzheimerove bolesti

Upravo zbog vrlo važne uloge proteina BDNF u mehanizmima AB-a, javila se i ideja o korištenju ovog neurotrofina u terapijske svrhe. Nagahara sa suradnicima (2009) proveo je istraživanje djelovanja BDNF-a na različitim životinjskim modelima AB-a (glodavci i primati). Kod svih životinja došlo je do smanjivanja simptoma bolesti nakon što je egzogeno primijenjen BDNF. Korišteni transgenični miševi, koji su u genu za APP imali dvije mutacije na mjestima cijepanja β -sekretazom i γ -sekretazom, pojačano su akumulirali A β . Kada je životinja dostigla 6-7 mjeseci starosti pojavila su se i prva ozbiljna kognitivna oštećenja (Nagahara i sur., 2009). Nakon injiciranja gena BDNF u entorinalni korteks ovih miševa došlo je do obnove sinapsi, staničnog signaliziranja, poboljšanja procesa učenja i upamćivanja (memorije) (Nagahara i sur., 2009). Autori su svoje rezultate potvrdili na modelu štakora i primata (rezus makaki), pokazujući i pozitivan učinak primjene ovog neurotrofina na gubitak kognitivnih funkcija u slučaju neurodegeneracije povezane sa starenjem.

Spomenuti rezultati upućuju na moguće korištenje egzogenog BDNF-a u terapijske svrhe kod osoba koje boluju od demencije. No, ovakva primjena BDNF-a sa sobom povlači neka dodatna pitanja koja treba prvotno razmotriti. Prvi problem je trenutačno nepoznata količina egzogenog BDNF-a koja bi na ovaj način mogla doći do mozga i zahvaćenih neurona, a koja je onda izravno povezana i s količinom ovog neurotrofina koja bi se davala pacijentima u takvom obliku terapije. Nedovoljne količine BDNF-a ne bi dale željeni učinak, a prevelike količine mogle bi imati neželjeni učinak na unutarstanične mehanizme vezane za djelovanje BDNF-a. Drugi problem s kojim se znanstvenici susreću je način selektivne dostave BDNF-a u željene regije mozga. Jedna od metoda dostave BDNF-a isprobana je kod štakora s lezijama u leđnoj moždini, a radi se o dostavi BDNF-a u obliku transplantata fibroblasta koji su genetički modificirani tako da proizvode i izlučuju BDNF (Tobias i sur., 2001). Također, napravljena je i uspješna kombinacija biokompatibilnih polimera i genetički modificiranih fibroblasta koji proizvode BDNF (Loh i sur., 2001). Ovi mehanizmi dostave mogli bi biti korisni i u terapiji neurodegenerativnih poremećaja.

Iz navedenog je vidljivo da postoji potencijal korištenja neurotrofina BDNF u svrhu terapije, ali i u svrhu što bolje i ranije dijagnostike AB-a, tj. u svrhu ublažavanja simptoma te usporavanja razvoja bolesti. Velika nada polaže se i u receptore p75NTR i TrkB kao moguće terapijske mete u liječenju neurodegeneracije.

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Demencija je sindrom globalnog i progresivnog oštećenja stečenih kognitivnih sposobnosti koji rezultira otežanim obavljanjem svakodnevnih aktivnosti i koji je često popraćen i dodatnim neurološkim ili psihijatrijskim simptomima. Ovo istraživanje daje bolji uvid u ulogu BDNF-a u demenciji, točnije u ulogu ovog neurotrofina u razvoju kognitivnih te bihevioralnih i psiholoških simptoma demencije.

Hipoteze istraživanja

- Promjene u koncentraciji BDNF-a i različite genetičke varijante gena za BDNF i TrkB bit će povezane s razvojem demencije i s razvojem kognitivnih te bihevioralnih i psiholoških simptoma demencije.
- Analiza ekspresije gena za BDNF i gena (SORL1) koji kodira za sortirajući receptor proteina APP (SORLA, engl. *sorting protein-related receptor with A-type repeats*) pokazat će da postoji razlika u ekspresiji ovih gena, na razini mRNA, između pojedinaca s dijagnozom AB-a i onih s dijagnozom MCI-a.
- Ovo istraživanje ponudit će lako dostupne biokemijske i genetičke pokazatelje koji će u budućnosti doprinijeti pravovremenoj dijagnostici demencije, ublažavanju simptoma bolesti te boljem praćenju progresije bolesti i odgovora na terapiju.

Ciljevi istraživanja

- Definirati ulogu promjene koncentracije BDNF-a u razvoju demencije usporedbom osoba s dijagnozom AB-a i drugih tipova demencija u odnosu na ispitanike s dijagnozom MCI-a.
- Analizirati potencijalnu ulogu promjene koncentracije BDNF-a u plazmi u razvoju kognitivnih te bihevioralnih i psiholoških simptoma demencije.
- Definirati ulogu pet različitih polimorfizama u genu za BDNF (rs6264, rs11030104, rs7934165, rs1519480, rs56164415) i ulogu jednog polimorfizma u genu za receptor BDNF-a TrkB (rs1439050) u razvoju demencije.
- Definirati ulogu pet polimorfizama u genu za BDNF (rs6264, rs11030104, rs7934165, rs1519480, rs56164415) i ulogu jednog polimorfizma u genu za TrkB (rs1439050) u razvoju kognitivnih te bihevioralnih i psiholoških simptoma demencije.
- Analizirati mogući učinak polimorfizama gena za protein BDNF na koncentraciju BDNF-a u plazmi ispitanika s dijagnozom demencije ili MCI-a.
- Istražiti ekspresiju gena BDNF i SORL1, na razini njihove mRNA, kako bi se utvrdila potencijalna razlika u ekspresiji navedenih gena između pacijenata s dijagnozom AB-a i onih koji imaju dijagnozu MCI-a.

3. **M**ATERIJALI I METODE

3.1. Ispitanici

U istraživanje je uključeno ukupno 318 ispitanika (47,1% muškaraca). Medijan dobi za sve ispitanike iznosio je 74 godine (25.-75. percentil = 66-80; raspon = 41-94 godine; prosječna dob = $72,7 \pm 10,7$ godina). Kod 207 ispitanika postavljena je dijagnoza AB-a, kod 59 dijagnoza MCI-a, a 52 ispitanika imalo je dijagnozu ostalih tipova demencije (VaD, FTD, DLB).

Tijekom planiranja istraživanja, broj ispitanika, koji bi trebao biti dovoljan da se statistički potvrdi (za graničnu p vrijednost od 5%), s prihvatljivo velikom mogućnosti (snaga istraživanja od 80%) i sa srednjom veličinom učinka ($r=0,20$), razlika između skupina u istraživanom parametru vezanom za ishod istraživanja (koncentracija proteina BDNF u plazmi i raspodjela genotipova s obzirom na istraživane polimorfizme gena BDNF), određen je koristeći program G*Power 3.1 (Faul i sur., 2007). U slučaju usporedbi za koje bi se koristila analiza varijance (ANOVA), pomoću programa G*Power određena je veličina uzorka od 246 ispitanika, dok je u slučaju usporedbi za koje će se koristiti χ^2 test potreban uzorak od 241 ispitanika. Prema ovim a priori analizama snage uzorka, tj. potrebne veličine uzorka, možemo zaključiti da je naš uzorak od ukupno 318 ispitanika dovoljan da procijenimo mjeru glavnog ishoda sa zadanom preciznošću.

3.1.1. Klinička obrada ispitanika

Ispitanici uključeni u istraživanje nisu uzimali prethodno nikakve antidementike te nisu bili međusobno u rodu, a svi su liječeni na Klinici za neurologiju i Klinici za psihijatriju Kliničkog bolničkog centra Zagreb. Odgovarajuća dijagnoza ispitanika postavljena je od strane suradnika na projektu, neurologa i psihijataru, temeljem dijagnostičkih (NINCDS-ADRDA i DSM-IV) kriterija, a na osnovi kognitivnog testiranja, analize cerebrospinalnog likvora, kao i neuroslikovnih prikaza. Kod svih bolesnika uzeta je detaljna anamneza, opći, neurološki i neurokognitivni statusi, a simptomi su evaluirani pomoću neuroloških i psihijatrijskih kliničkih instrumenata, strukturiranog kliničkog intervjua i neuropsihijatrijskih i psiholoških ocjenskih ljestvica.

Dijagnoze pacijenata temeljene su na NINCDS-ADRDA (Jack i sur., 2011; McKhann i sur., 1984) i DSM-IV (APA, 2000) kriterijima prema kojima demencija mora biti utvrđena kliničkim pregledom i potvrđena neuropsihološkim testiranjem, a kod ispitanika mora biti prisutan deficit, koji prati i progresivno pogoršanje, u dvije ili više kognitivnih domena (koje uključuju i pamćenje). Osoba ne smije imati poremećaj stanja svijesti, sistemsku bolest ili bolesti mozga koje bi mogle utjecati na progresivni deficit pamćenja i kognicije. Također, prvi simptomi bolesti moraju se pojaviti u razdoblju od 40. do 90. godine života (najčešće nakon 65. godine).

3.1.2. Psihometrijski testovi u dijagnozi demencije

U sklopu neurokognitivnog ispitivanja bolesnika, za procjenu kognitivnih oštećenja u demenciji, korišteni su testovi:

- MMSE,
- CDT,
- skala procjene Alzheimerove bolesti (ADAS, engl. *Alzheimer's Disease Assessment Scale*) - kognitivna podskala (ADAS-Cog),
- klinička skala za rangiranje demencije (CDR skala, engl. *Clinical Dementia Rating scale*).

Za procjenu BPSD-a korišteni su neuropsihijatrijskih testovi:

- NPI
- BEHAVE-AD.

3.1.2.1. Psihometrijski testovi korišteni za procjenu kognitivnih oštećenja u demenciji

Test procjene mentalnog stanja

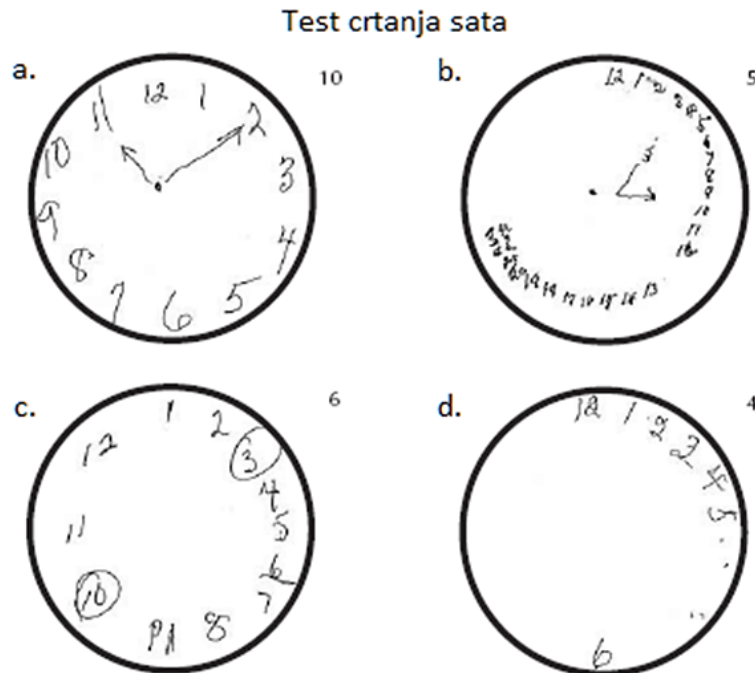
MMSE je psihometrijski test (Cockrell i Folstein, 1988; Folstein i sur., 1975) koji se najčešće koristi za procjenu kognitivnih sposobnosti u dijagnozi demencije. MMSE se koristi za detekciju razine kognitivnih oštećenja, za praćenje kognitivnih funkcija tijekom vremena te za procjenu efikasnosti terapije. Ovaj test procjenjuje pažnju, budnost, govor, orijentaciju, memoriju, razumijevanje, imenovanje i ponavljanje, čitanje i pisanje, računanje te diskriminaciju lijevo-desno. MMSE se sastoji od različitih pitanja koja se boduju s nula bodova ili s jednim bodom. Najveći zbroj bodova koji osoba može ostvariti na testu MMSE je 30, a veći broj bodova povezuje se s boljim kognitivnim sposobnostima. Prema broju bodova na MMSE-u osobe možemo podijeliti na:

- osobe s normalnim kognitivnim sposobnostima (broj bodova od 27 do 30),
- osobe s blagom demencijom (broj bodova od 21 do 26),
- osobe s umjerenom demencijom (broj bodova od 10 do 20),
- osobe s teškim oblikom demencije (broj bodova < 10).

Test crtanja sata

CDT je test koji se koristi kao još jedna mjera ozbiljnosti simptoma demencije (Lee i sur., 1996; Sunderland i sur., 1989). Postoji više varijacija u samom načinu primjene testa, ali u pravilu najčešće pacijent dobije ili unaprijed nacrtanu kružnicu u koju mora sam ucrtati brojeve te kazaljke sata koje pokazuju točno određeno vrijeme ili se pacijentu da prazan list papira na koji sam mora ucrtati cijeli sat (kružnicu, brojeve i kazaljke). Vrijeme koje se često zadaje pacijentu da ga naznači na satu je 10 minuta nakon 11 sati. Ovim testom se zapravo procjenjuje funkcioniranje frontalnih i temporo-parijetalnih regija mozga. Prednost ovog testa je što upućuje na ozbiljnost demencije, a trajanje testa je vrlo kratko (oko dvije minute).

Za bodovanje rezultata CDT-a često se koristi metoda koju je definirao Sunderland sa suradnicima (1989), a koja predlaže korištenje unaprijed određenog graničnog broja bodova (≤ 5) koji ukazuje na oštećenje (Slika 12).



Slika 12. Primjer bodovanja testa crtanja sata metodom koju je predložio Sunderland sa sur. (1989).

a. broj ostvarenih bodova je 10 (kazaljke sata su u pravilnom položaju); **b.** broj ostvarenih bodova je 5 (brojevi na satu su svi napisani na jednom okupu ili su napisani u obrnutom smjeru, a kazaljke na satu mogu biti prisutne, ali nisu u točnom položaju); **c.** broj ostvarenih bodova je 6 (brojevi na satu su u pravilu dobro napisani, ali su kazaljke u pogrešnom položaju); **d.** broj ostvarenih bodova je 4 (brojevi su u potpunosti pogrešno napisani, često nedostaje dio brojeva ili su napisani izvan kružnice sata).

Skala procjene Alzheimerove bolesti - kognitivna podskala (ADAS-Cog)

ADAS-Cog je često korišten psihometrijski test za procjenu razine kognitivnog oštećenja u demenciji (Ihl i sur., 2000; Rosen i sur., 1984; Weyer i sur., 1997). Skala se sastoji od 11 stavki koje se boduju bodovima od 0 do 5 s obzirom na razinu oštećenja (0 označava da nema oštećenja, a 5 najveći stupanj oštećenja). Ukupni broj bodova na podskali ADAS-Cog kreće se u rasponu od 0 do 70 gdje, suprotno nego u slučaju testa MMSE, veći broj bodova (≥ 18) ukazuje na značajnije kognitivno oštećenje. Test ukupno traje oko 30 minuta.

Stavke podskale ADAS-Cog koje se testiraju su:

- prisjećanje riječi (0-10 bodova),
- imenovanje (0-5 bodova),
- izvršavanje naredbi (0-5 bodova),
- konstrukcijska praksa tj. crtanje figura (0-5 bodova),
- idejna praksa (0-5 bodova),
- orijentacija (0-8 bodova),
- prepoznavanje riječi (0-12 bodova),
- govor (0-5 bodova),
- razumijevanje govora (0-5 bodova),
- problem u nalaženju riječi (0-5 bodova),
- pamćenje uputa testa (0-5 bodova).

Klinička skala za rangiranje demencije

Skala CDR je razvijena kako bi se odredio stupanj ozbiljnosti demencije. Skala je u početku korištena isključivo u slučajevima dijagnoze AB-a, ali se može koristiti i za rangiranje ozbiljnosti demencije i u drugim stanjima. Ukupni CDR rang koristi se za definiranje stupnja ozbiljnosti demencije i to tako da rang CDR-0 označava da nema nikakvog kognitivnog oštećenja, a daljnje točke označavaju različite stupnjeve demencije:

- CDR-0,5 = vrlo blagi oblik demencije,
- CDR-1 = blagi oblik demencije,
- CDR-2 = umjereni oblik demencije,
- CDR-3 = teški oblik demencije.

CDR skala se sastoji od 6 domena koje se zasebno ocjenjuju, a koje se narušene kod pacijenata s AB-om. Radi se o domenama: pamćenje, orijentacija, prosuđivanje, rješavanje problema, izvršavanje društvenih obaveza, dom i hobiji, osobna njega.

Svaka od domena ocjenjuje se s obzirom na ozbiljnost oštećenja (Tablica 3). Pri ocjenjivanju pomoću skale CDR, domena vezana za procjenu memorije, tj. pamćenja je glavna, a ostalih 5 su sekundarne.

Tablica 3. Broj bodova prema ozbiljnosti oštećenja za pojedine domene koje se ocjenjuju u sklopu kliničke skale za rangiranje demencije (CDR).

Oštećenje u pojedinim domenama	Broj CDR bodova
Nema oštećenja	0
Upitno oštećenje	0,5
Blago oštećenje	1
Umjereno oštećenje	2
Teško oštećenje	3

3.1.2.2. Psihometrijski testovi korišteni za procjenu bihevioralnih i psiholoških simptoma u demenciji

Neuropsihijatrijski inventar

Demenciju uz kognitivni deficit prate i drugi psihološki i bihevioralni simptomi. NPI je razvijen kako bi omogućio procjenu neuropsihijatrijskih simptoma i psihopatologiju oboljelih od AB-a i drugih neurodegenerativnih bolesti (Cummings, 1997; Cummings i sur., 1994). NPI prati 12 neuropsihijatrijskih poremećaja (domena) koji se često javljaju u demenciji:

- deluzije (sumanutosti),
- halucinacije,
- agitacija/agresija,
- depresija/disforija,
- anksioznost,
- ushićenje/euforija,
- apatija/ravnodušnost,
- dezinhibicija,
- razdražljivost/labilnost,
- aberantno motoričko ponašanje,
- poremećaji spavanja i noćni nemir,
- poremećaji prehrane i apetita.

Svakoj domeni NPI-a dodjeljuju se bodovi na temelju intervjua kliničara sa skrbnikom. Za svaku domenu bodovanje se vrši s obzirom na frekvenciju i ozbiljnost simptoma, ali i s obzirom na to koliko uznemiravajuće ti simptomi djeluju na skrbnika. U slučaju da određeni simptom nije prisutan tada osoba na toj domeni ima 0 bodova te nije potrebno ispunjavati dodatna pitanja vezana za tu domenu. Ukupan broj bodova na svakoj domeni predstavlja umnožak bodova vezanih za frekvenciju i

onih za ozbiljnost simptoma (frekvencija x ozbiljnost). Za cijelu skalu, ukupan broj bodova dobiva se zbrojem bodova svih 12 domena.

Frekvencija se boduje na skali od 1 do 4 (1 = rijetko, 2 = ponekad, 3 = često, 4 = vrlo često), a ozbiljnost (težina) simptoma na skali od 1 do 3 (1 = blagi, 2 = umjereni, 3 = teški tj. ozbiljni). Emocionalno uznemiravajući utjecaj pojedinih ponašanja na skrbnika dodatno se boduje na skali od 0 do 5, gdje 0 označava da ponašanje ne djeluju uznemirujuće na skrbnika, a 5 označava vrlo ozbiljan emocionalno uznemiravajući utjecaj.

Skala za procjenu bihevioralne patologije u Alzheimerovoj bolesti

BEHAVE-AD je originalna bihevioralna skala posebno dizajnirana za pacijente koji boluju od AB-a (Auer i sur., 1996; Reisberg i sur., 1996). Skala se sastoji od dva dijela. Prvi dio je koncentriran na simptomatologiju, a drugi dio uključuje bodovanje simptoma na ljestvici od 0 do 3 prema ozbiljnosti pojedinih simptoma. Skala se sastoji od 25 stavki koje su podijeljene u 7 kategorija.

Kategorije skale BEHAVE-AD uključuju:

- paranoju i deluzije (stavke 1-7),
- halucinacije (stavke 8-12),
- promjene u aktivnosti (stavke 13-15),
- agresiju (stavke 16-18),
- poremećaje spavanja (stavka 19),
- raspoloženje (stavke 20-21),
- anksioznost (stavke 22-25).

Za ispunjavanje skale BEHAVE-AD treba oko 20 minuta, a sama skala je napravljena tako da bi bila korisna za prospektivne studije bihevioralnih simptoma te za primjenu u farmakološkim testiranjima za dokumentaciju spomenutih simptoma.

3.1.3. Etički aspekt istraživanja

Svim ispitanicima ili njihovim skrbnicima u detalje je objašnjena svrha i postupak istraživanja te se uzorkovanje vršilo tek nakon što su ispitanici ili njihovi skrbnici dobrovoljno potpisali informirani pristanak. Sva istraživanja su provedena uz odobrenje Etičkog povjerenstva KBC Zagreb i uz potpunu suradnju i primjereno razumijevanje sudionika. Istraživanja su bila potpuno usklađena s etičkim standardima postavljenim Helsinškom deklaracijom iz 1964. godine.

3.2. Obrada uzoraka krvi

Uzorci krvi svih ispitanika prikupljeni su kod osoba koje su bile natašte, pri prvom pregledu u prijedodnevni satima tijekom uobičajenih laboratorijskih testova te su unutar 24 sata dodatno obrađeni (izdvajanje trombocita, mononuklearnih stanica periferne krvi i plazme) za daljnje analize.

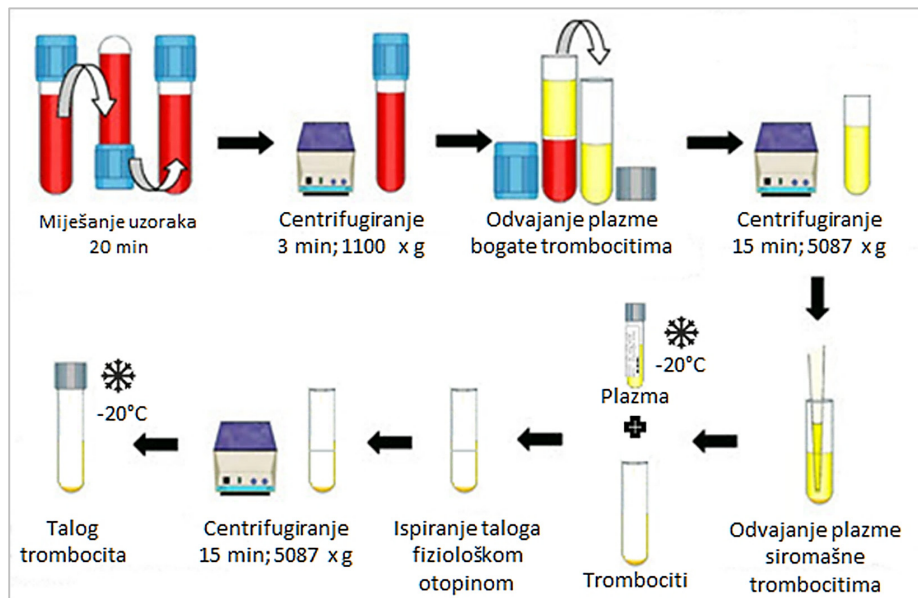
3.2.1. Postupak izdvajanja plazme siromašne trombocitima iz uzoraka pune krvi

Kemikalije

- Fiziološka otopina: $w(\text{NaCl}) = 0,9\%$

Postupak

Ispitanicima je izvađena krv (8 ml) u staklene epruvete za hematološke analize (BD Vacutainer®) s 2 ml konzervansa, tj. antikoagulansa koji sadrži limunsku kiselinu, natrij citrat i dekstrozu (ACD, engl. *Acid Citrat Dextrose*). Svakom ispitaniku je uzet uzorak krvi pri prvom pregledu kada je osoba bila natašte. Uzorkovanje je napravljeno u prijedodnevni satima tijekom uobičajenih laboratorijskih testova, a uzorci krvi su dostavljeni i obrađeni unutar 24 sata na Institutu „Ruđer Bošković“ u Laboratoriju za molekularnu neuropsihijatriju. Serijom centrifugiranja iz pune krvi prvo je izdvojena plazma (3 min na 1100 x g), a zatim iz plazme trombociti (15 min na 5087 x g) kao bi se dobila plazma siromašna trombocitima (Slika 13). Plazma, trombociti i preostali dio krvi s leukocitima za izolaciju deoksiribonukleinske kiseline (DNA) pohranjeni su na -20°C za daljnje analize.



Slika 13. Postupak obrade uzoraka krvi.

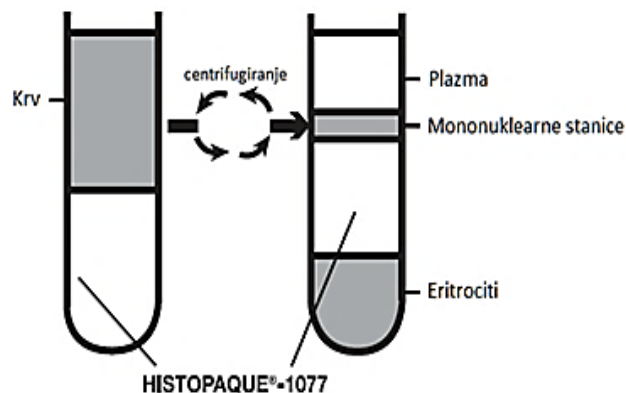
3.2.2. Postupak izolacije mononuklearnih stanica periferne krvi

Kemikalije:

- Histopaque®-1077 (Sigma-Aldrich, SAD): gustoća $1,077 \pm 0,001$ g/ml
- Fosfatni pufer (Gibco®, SAD): pH 7,4
- QIAzol reagens za liziranje uzoraka (engl. *QIAzol Lysis Reagent*, Qiagen, SAD)

Postupak:

Uzorci krvi koji su korišteni za određivanje genske ekspresije vađeni su također u staklene epruvete za hematološke analize (BD Vacutainer™), volumena 5 ml, s etilendiamin tetra-acetat (EDTA) antikoagulansom. Svakom ispitaniku izvađene su dvije epruvete krvi. Uzorci krvi ispitanika prikupljeni su od osoba koje su bile natašte, pri prvom pregledu u prijedodnevni satima tijekom uobičajenih laboratorijskih testova. Uzorci su dostavljeni i obrađeni unutar 24 sata u Centru za funkcionalnu genomiku Medicinskog fakulteta u Zagrebu. Mononuklearne stanice periferne krvi izdvojene su na gradijentu gustoće koristeći Histopaque®-1077 (Sigma, SAD) (Slika 14). Puna je krv nadslojena na Histopaque®-1077 u omjeru 2:1. Uzorak je potom centrifugiran 17 min na $800 \times g$ (24°C). Uz pomoć Pasteurove pipete pokupljen je mononuklearni prsten. Nakon toga su mononuklearne stanice dva puta isprane s fosfatnim puferom (Gibco®, SAD), prvi put centrifugiranjem 10 min na $500 \times g$ (24°C), a drugi put centrifugiranjem 7 min na $400 \times g$ (4°C). Nakon ovog koraka uzorci su stavljeni na led. Zadnje ispiranje napravljeno je s hladnim fosfatnim puferom, a uzorci su centrifugirani ponovo 7 min na $400 \times g$ (4°C) nakon čega je odliven supernatant, a stanice su resuspendirane u 1 ml fosfatnog pufera i stavljene na led. Stanice su zatim izbrojene u Buerker-Tuerckovoj komorici, a udio živih stanica određen je pomoću tripanskog modrila. Stanicama za izolaciju mRNA dodan je QIAzol reagens za liziranje uzoraka (engl. *QIAzol Lysis Reagent*, Qiagen, SAD) i one su pohranjene na -80°C .



Slika 14. Izolacija mononuklearnih stanica periferne krvi na gradijentu gustoće koristeći Histopaque®-1077.

3.3. Izdvajanje genomske DNA iz krvi

Za izdvajanje genomske DNA iz krvi koristili smo metodu isoljavanja (Slika 15) koja se bazira na metodi koju je uspostavio Miller sa suradnicima (Miller i sur., 1988).

Ova metoda izolacije genomske DNA temelji se na uklanjanju proteina iz staničnog lizata razgradnjom pomoću enzima proteinaze K te isoljavanjem. Isoljavanje se odnosi na povećanje koncentracije soli u vodenoj otopini koja onda na sebe privlači molekule vode i tako smanjuje interakciju proteina (hidrofilnih aminokiselina) s molekulama otapala te povećava protein-protein interakcije koje dovode do agregacije proteina i njihovog taloženja. Nakon izdvajanja proteina iz vodene otopine, DNA se precipitira pomoću izopropanola. DNA je dobro topiva u vodi zbog izrazite polarnosti vode. Izopropanol je slabije polaran u odnosu na vodu, tako da se dodatkom izopropanola povećavaju ionske interakcije između fosfatnih skupina molekule DNA i pozitivno nabijenih iona (Na^+) u otopini. Nastanak ovih stabilnih ionskih veza smanjuje topivost DNA i dovodi do njezine precipitacije.

Kemikalije

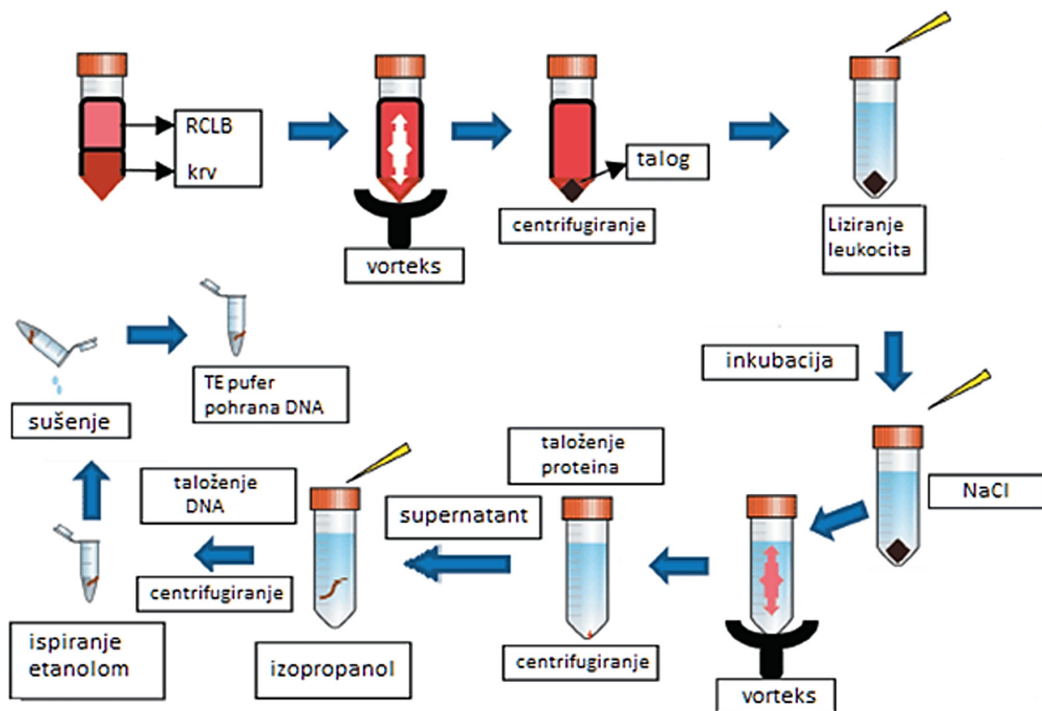
- Pufer za liziranje eritrocita (RCLB, engl. *Red Cell Lysis Buffer*): 10 mM Tris (Trizma® base, Sigma Aldrich, SAD), 5 mM MgCl_2 (Kemika, Hrvatska), 10 mM NaCl (Kemika, Hrvatska); pH 7.6
- Pufer SE: 75mM NaCl, 25mM EDTA (Sigma Aldrich, SAD); pH 8
- NaCl (Kemika, Hrvatska): 5 M otopina
- Proteinaza K (TaKaRa Bio, Japan): 20 mg/ml
- Natrijev dodecil sulfat (SDS) (Sigma Aldrich, SAD): 10%-tna otopina
- Etanol (Kemika, Hrvatska): 96%-tna i 70%-tna otopina
- Izopropanol (Kemika, Hrvatska)
- Pufer TE (Sigma Aldrich, SAD): 10 mM Tris (Trizma® base, Sigma Aldrich, SAD), 1 mM EDTA (Sigma Aldrich, SAD); pH 7.6

Postupak

Nakon odmrzavanja, uzorci su miješani 20 min na valjkastoj miješalici, a nakon toga je izdvojeno iz svakog uzorka 300 μl krvi i prebačeno u zasebne Eppendorf mikroeprevete od 1,5 ml (Eppendorf, UK). Na uzorke krvi dodano je po 900 μl RCLB-a kako bi se lizirali eritrociti. Uzorci su dobro promiješani pomoću vorteks miješalice i ostavljeni su 10 min na ledu. Nakon liziranja eritrocita uzorci su centrifugirani (13000 x g, 2 min, 4°C) pri čemu su lizirani eritrociti ostali u supernatantu, a netaknuti leukociti su istaloženi. Supernatant je uklonjen, a talog je dodatno pročišćen resuspendiranjem u RCLB-u (900 μl) i ponovnim centrifugiranjem (13000 x g, 2 min, 4°C). Na dovoljno čisti talog (nakon 3-4 ispiranja RCLB-om) dodano je 300 μl SE pufera i 30 μl 10%-tnog SDS-a.

Uzorci su lagano promiješani okretanjem mikroepruvete, a zatim je u svaki uzorak dodano još 1,5 μl proteinaze K. Slijedi inkubacija uzoraka u grijaćem bloku 2 sata na 56°C pri čemu se leukociti liziraju.

Nakon inkubacije u uzorke je dodana 1/3 volumena 5 mM NaCl ($\approx 200 \mu\text{l}$) i sve skupa je promiješano vorteks miješalicom 10 s. Nakon centrifugiranja (13000 x g, 5 min, sobna temperatura) genomski DNA ostala je otopljena u supernatantu, a ostali stanični dijelovi su istaloženi. Supernatant je prebačen u novu sterilnu Eppendorf mikroepruvetu, dodana su 2 volumna udjela hladnog izopropanola ($\approx 800 \mu\text{l}$) i uzorci su lagano promiješani. Tijekom ovog koraka dolazi do taloženja DNA te je ona vidljiva u obliku netopivog spleta. Centrifugiranjem 2 min na 13000 x g, talog je spušten na dno mikroepruvete. Supernatant je odliven, a talog je dodatno ispran dodatkom 400 μl 75 %-tnog etanola i centrifugiranjem 2 min na 13000 x g pri sobnoj temperaturi. Nakon ispiranja, supernatant je odliven, a mikroepruvete su dodatno posušene prislanjanjem na papir i sušenjem 20 min s otvorenim poklopcem u digestoru. Osušenom talogu dodano je 100 μl TE pufera te su uzorci ostavljeni preko noći na sobnoj temperaturi kako bi se DNA u potpunosti otopila. Nakon toga uzorci su pohranjeni na +4 ili -20°C.



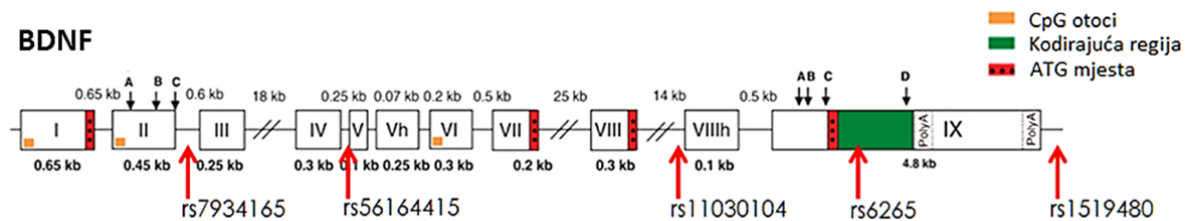
Slika 15. Postupak izolacije DNA metodom ispljavanja.

3.4. Genotipizacija polimorfizama gena za moždani neurotrofni čimbenik i tropomiozin-receptor-kinazu B

Istraživano je ukupno 5 polimorfizama gena BDNF i jedan SNP unutar gena za TrkB. Istraživani polimorfizmi (Slika 16) gena BDNF su:

- rs1519480,
- Val66Met (rs6265),
- rs11030104,
- C270T (rs56164415),
- rs7934165,

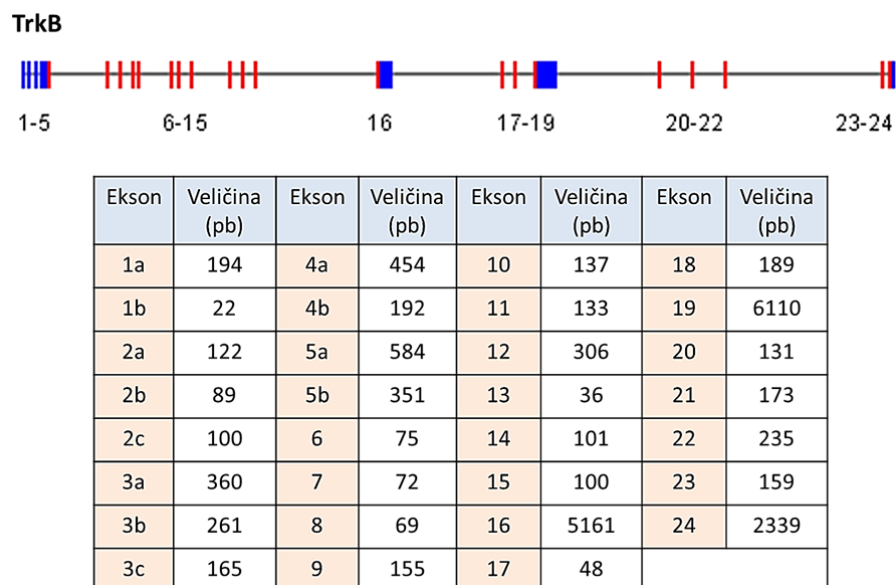
Ovi polimorfizmi odabrani su jer je poznato da funkcionalni polimorfizam Val66Met, smješten u kodonu 66, ima ulogu u transportu BDNF-a u dendritima, dok bi polimorfizam C270T, smješten u 5' nekodirajućoj regiji gena, mogao biti povezan sa smanjenom produkcijom BDNF-a. Polimorfizmi rs7934165 i rs11030104 smješteni su u intronskim regijama gena za BDNF i mogli bi utjecati na proces alternativnog prekrivanja introna koji je odgovoran za nastanak različitih transkripta ovog gena koji se eksprimiraju različito u pojedinim tkivima kao odgovoru na različite podražaje. Polimorfizam rs1519480 smješten je izvan kodirajuće regije gena za BDNF, ali postoje indikacije da utječe na transkripciju mRNA.



Slika 16. Položaj istraženih polimorfizama unutar gena za moždani neurotrofni čimbenik (BDNF).

Preuzeto i prilagođeno iz: Boulle i sur. (2012).

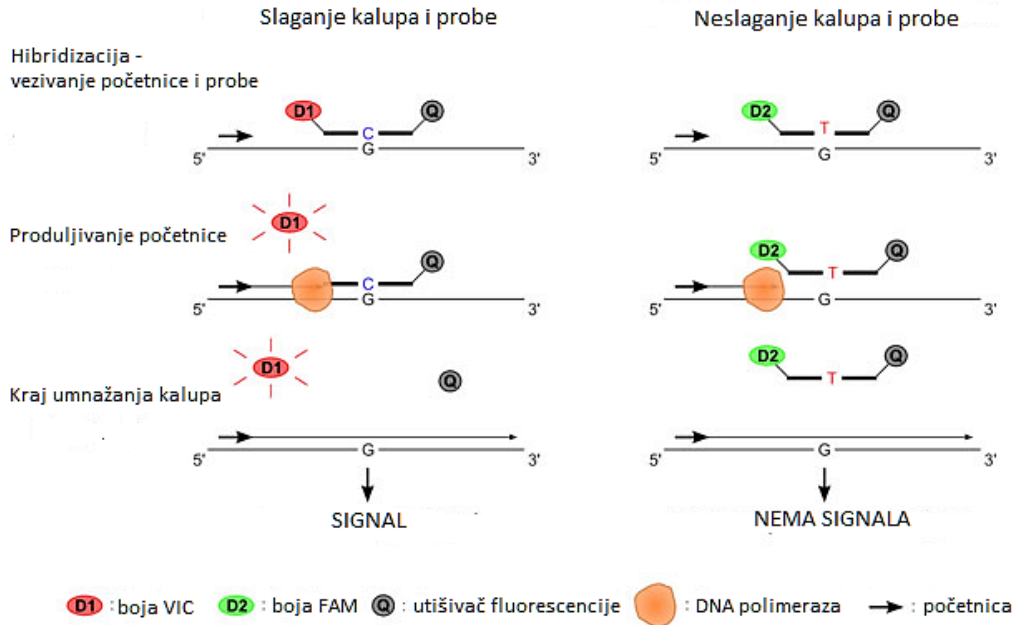
Gen koji kodira za TrkB ima ukupno 24 eksona (Slika 17), organiziranih u ukupno 5 klastera, i 23 introna, a sam gen je dugačak 590 kb (Stoilov i sur., 2002). Koristeći alternativne promotore, proces alternativnog prekrivanja introna te poliadenilacijska mjesta ovaj gen može dati oko 100 različitih izoformi koje kodiraju za ukupno 10 proteina (Stoilov i sur., 2002). Unutar gena za TrkB za istraživanje je odabran SNP rs1439050, smješten u četvrtom intronu, koji bi mogao utjecati na ekspresiju transkripta TrkB.



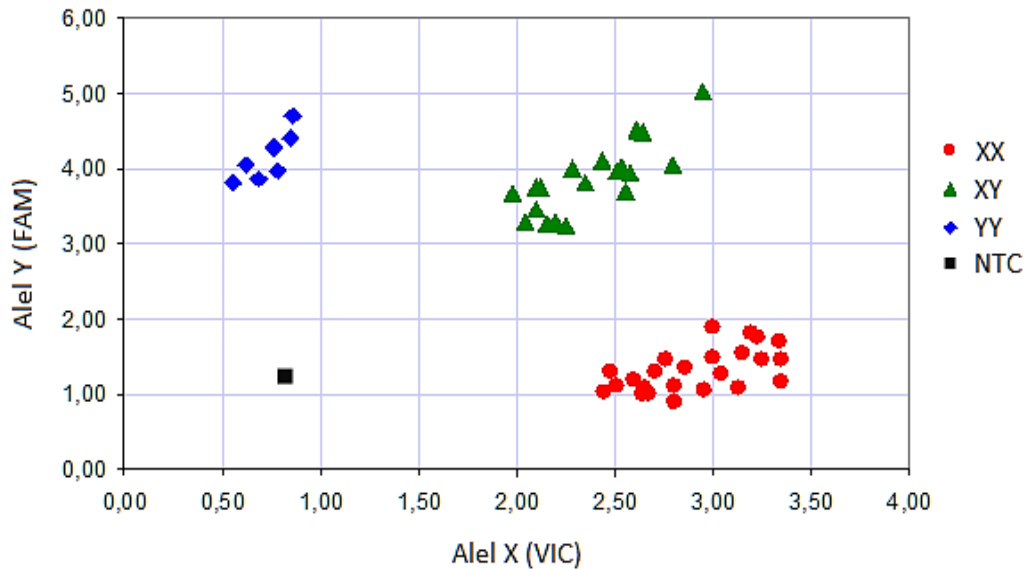
Slika 17. Shematski prikaz rasporeda eksona i introna unutar gena za tropomiozin-receptor-kinazu B (TrkB).

Spomenuta metoda genotipizacije pomoću komercijalnih kompleta tvrtke Applied Biosystems® (SAD) temelji se na hibridizaciji fluorescentno obilježenih oligonukleotidnih proba i njima komplementarnih polimorfnih mjesta na genomskoj DNA (Slika 18). Svaka od dviju proba u reakcijskoj smjesi je na 5' kraju obilježena jednom fluorescentnom bojom (VIC ili FAM) i specifično se veže za slijed koji sadrži jednu promijenjenu bazu (Slika 18). 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 (PCR, engl. *Polymerase Chain Reaction*), utišivač i boja se nalaze na takvoj udaljenosti koja omogućuje utišivaču da spriječi fluorescenciju boje. Prilikom produljivanja početnica termostabilna DNA polimeraza cijepa vezane probe, boja više nije pod utjecajem utišivača te počinje fluorescirati što se bilježi uređajem kao signal (Slika 18). Jačina i vrsta dobivenog signala omogućuju određivanje genotipa. Fluorescencija jedne boje upućuje na homozigotnost jednog alela, a fluorescencija obje boje upućuje na prisutnost oba alela, tj. heterozigotnost.

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 u svakom pojedinom uzorku, a konačan prikaz rezultata uključuje ispis razine fluorescencije za svaku boju te grafički prikaz istih (Slika 19).



Slika 18. Shematski prikaz metode lančane reakcije polimeraze u stvarnom vremenu.



Slika 19. Grafički prikaz rezultata genotipizacije metodom lančane reakcije polimeraze u stvarnom vremenu.

Na osima x i y su vrijednosti fluorescentnog signala. Probe konstruirane za alel X obilježene su fluorescentnom bojom VIC, a za alel Y bojom FAM. Crveni krugovi na slici označavaju homozigote za alel X, plavi rombovi homozigote za alel Y, a zeleni trokuti heterozigote kod kojih je prisutna podjednaka fluorescencija obaju fluorescentnih boja. Oznaka NTC (crni kvadrat) odnosi se na negativnu kontrolu u kojoj nema kalupa.

Kemikalije

- Komercijalno dostupni kompleti (Applied Biosystems®, SAD):
 - TaqMan® mješavina početnica i proba (engl. *TaqMan® Pre-designed SNP Genotyping Assay*)
 - Pristupni broj za Applied Biosystems®: C_11592758_10 (rs6265), C_1751792_10 (rs11030104), C_11592757_20 (rs1519480), C_1197567_10 (rs7934165), C_7424004_10 (rs1439050)
 - TaqMan® mješavina početnica i proba izrađena po narudžbi (engl. *Custom TaqMan® SNP Genotyping Assay*) za polimorfizam C270T (rs56164415) (željeni komplet oligonukleotida i početnica konstruiran je računalnim programom File builder (<https://www2.appliedbiosystems.com/support/software/filebuilder/>) u koji je ubačena željena sekvenca gena unutar koje se nalazi SNP)
- Otopina za genotipizaciju (Applied Biosystems®, SAD): TaqMan® matična mješavina za genotipizaciju (engl. *TaqMan® Genotyping Master Mix*)

Postupak

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 uvjete za aktivnost DNA-polimeraze. Ukupni volumen korištene reakcijske smjese za genotipizaciju bio je 25 µl, a točan sastav reakcijske smjese i uvjeti reakcije prilikom genotipizacije prikazani su u Tablici 4 i Tablici 5. Za genotipizaciju uzoraka korišten je uređaj ABI Prism7300 Real time PCR System apparatus (Applied Biosystems®, SAD).

Tablica 4. Sastav reakcijske smjese za genotipizaciju metodom lančane reakcije polimeraze u stvarnom vremenu.

Sastojak reakcijske smjese	Početna koncentracija	Konačna koncentracija	Volumen po reakciji/µl ¹
TaqMan® matična mješavina za genotipizaciju	2 x	1 x	12,5
TaqMan® mješavina početnica i proba	40 x	1 x	0,625
Genomska DNA razrijeđena u deH ₂ O	oko 1,8 ng/µl	oko 0,8 ng/µl ²	11,25

¹ Volumen se prilagođava razmjerno ukupnom volumenu reakcijske smjese

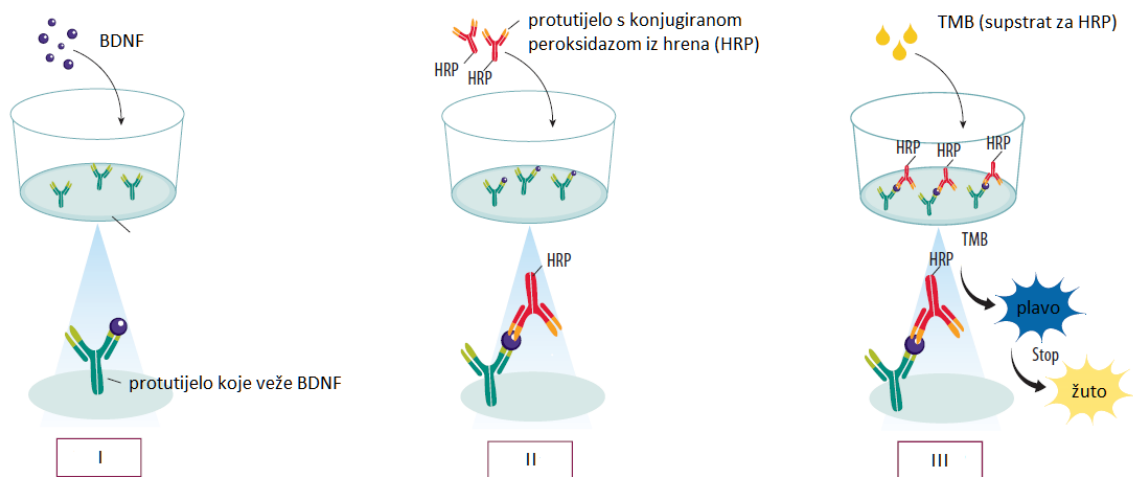
² 1-20 ng genomske DNA po reakcijskoj smjesi

Tablica 5. Uvjeti reakcije za genotipizaciju metodom lančane reakcije polimeraze u stvarnom vremenu.

Faze reakcije	Temperatura	Vrijeme
Početni korak	95°C	10 min
	55 ciklusa	
Denaturacija	92°C	15 s
Vezivanje i produljivanje početnica	60°C	60 s

3.5. Određivanje koncentracije moždanog neurotrofnog čimbenika u plazmi

Za određivanje koncentracije BDNF-a u plazmi korišten je komercijalno dostupan ELISA komplet tvrtke R&D Systems, Inc. (SAD i Kanada). Spomenuti komplet je odabran jer je u literaturi (Yoshida i sur., 2012) pokazano da vrlo uspješno detektira mBDNF u plazmi, ali ne i proBDNF. Komplet sadrži rekombinantni BDNF eksprimiran u *Sf21* stanicama i protutijela koja prepoznaju ovaj rekombinantni faktor. Minimalna koncentracija BDNF-a koja se može detektirati ovim ELISA kompletom je ispod 20 pg/ml. Ova metoda omogućuje kvantitativno određivanje BDNF-a u plazmi. Metoda se temelji na vezivanju željenog proteina na monoklonalno protutijelo koje je imobilizirano na mikropločicu nakon čega se na nastali kompleks dodaje drugo monoklonalno protutijelo konjugirano s enzimom (Slika 20). Nakon serije ispiranja kojima se uklanja višak nevezanog protutijela, dodatkom supstratne otopine dolazi do razvoja boje čiji je intenzitet proporcionalan količini proteina vezanog u početnom koraku reakcije (Slika 20).



Slika 20. Postupak određivanja koncentracije moždanog neurotrofnog čimbenika (BDNF) u plazmi pomoću komercijalno dostupnog kompleta za enzimski povezanu imunoapsorpcijsku analizu.

Preuzeto i prilagođeno od: R&D Systems, Inc. (<http://www.rndsystems.com>)

I. Vezivanje BDNF-a iz plazme na monoklonalna protutijela kojima je presvučena mikropločica; **II.** Vezivanje protutijela s konjugiranom peroksidazom iz hrena na postojeći kompleks imobiliziranog protutijela i BDNF-a; **III.** Dodavanje supstrata tetrametilbenzidina (TMB) čijom oksidacijom, pomoću peroksidaze iz hrena, dolazi do nastanka žutog obojenja koje je proporcionalno količini vezanog BDNF-a iz plazme.

Kemikalije

- Komercijalno dostupan ELISA komplet tvrtke R&D Systems, Inc. (SAD i Kanada) - Quantikine® ELISA Human BDNF Immunoassay:
 - Mikropločica: polistirenska mikropločica s 96 jažica presvučenim mišjim monoklonalnim protutijelom koje veže BDNF
 - BDNF standard: liofilizirani rekombinantni humani protein BDNF
 - BDNF konjugat (engl. *BDNF Conjugate*): mišje monoklonalno protutijelo koje veže BDNF konjugirano s peroksidazom iz hrena
 - Razrjeđivač kompleta RD1S (engl. *Assay Diluent RD1S*): puferirana proteinska baza
 - Kalibrirajuća otopina za razrjeđivanje RD6P (engl. *Calibrator Diluent RD6P*): životinjski serum
 - Pufer za ispiranje: 25x 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

Postupak

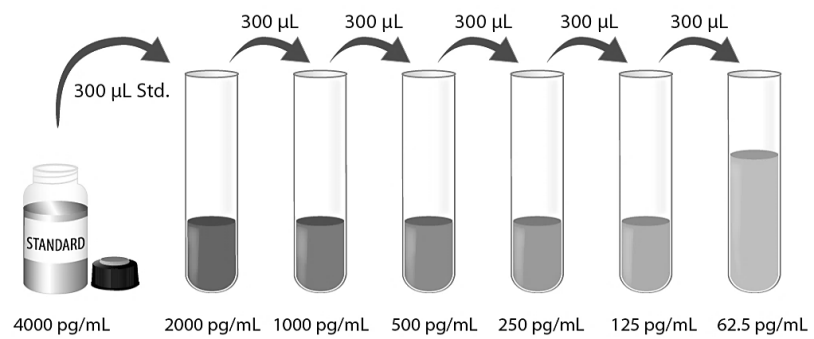
Za određivanje koncentracije BDNF-a u plazmi korišten je komercijalno dostupan ELISA komplet tvrtke R&D Systems, Inc. (SAD i Kanada) prema uputama koje daje proizvođač. Svi uzorci plazme prije određivanja koncentracije BDNF-a dodatno su centrifugirani 10 min na 10000g (4°C) kako bi se uklonili mogući ostaci trombocita. Uzorci su zatim razrijeđeni 4 puta koristeći kalibrirajuću otopinu za razrjeđivanje RD6P koja je dio ELISA kompleta. Za određivanje koncentracije BDNF-a korištene su mikropločice (96 jažica) presvučene monoklonalnim protutijelom koje na sebe veže BDNF iz uzoraka plazme. U svaku od jažica prvo je dodano 100 µl razrjeđivača kompleta RD1S, a zatim po 50 µl uzoraka plazme ili po 50 µl prethodno pripremljenih razrjeđenja BDNF standarda. Razrjeđenja standarda su pripremljena tako da se u konačnici dobije serija razrjeđenja različitih koncentracija (Tablica 6).

Standardi, kao i svi uzorci plazme, dodani su u jažice u duplikatima. U dvije jažice dodana je i negativna kontrola, tj. 50 µl kalibrirajuće otopine za razrjeđivanje RD6P. Mikropločica je zatim prekrivena adhezivnom folijom i ostavljena je 2 sata na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije od 2 sata u svaku jažicu dodano je po 100 µl BDNF konjugata, tj. na nastali kompleks protutijela i proteina BDNF dodano je drugo monoklonalno protutijelo koje specifično prepoznaje protein BDNF i na koje je vezana peroksidaza iz hrena. Nakon inkubacije od 1 sat 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 protein BDNF iz plazme. 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 hidrogen-peroksid. Mikropločica je

inkubirana 30 min na sobnoj temperaturi u mraku. Nakon 30 min u jažice je dodana otopina za zaustavljanje reakcije i unutar 30 min izmjerena je apsorbancija uzoraka na ELISA čitaču (Thermo Labsystems Multiskan EX Microplate Reader, SAD) pri 450 nm, uz korekciju pri 570 nm. Naknadno je prema uputama proizvođača, koristeći poznate koncentracije BDNF standarda, određena koncentracija BDNF-a u pojedinim jažicama.

Tablica 6. Priprema standardnih otopina moždanog neurotrofnog čimbenika (BDNF).

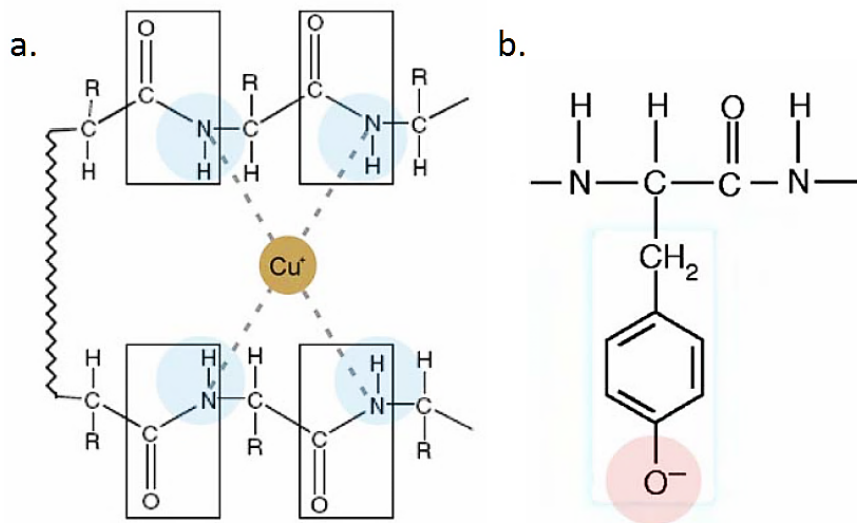
Standardni niz	S ₁	S ₂	S ₃	S ₄	S ₅	S ₆	S ₇
Koncentracija proteina BDNF (pg/ml)	4000	2000	1000	500	250	125	62,5



3.6. Određivanje ukupne koncentracije proteina u plazmi

Koncentracija ukupnih proteina u uzorcima plazme određena je metodom prema Lowryju (1951).

Princip iza metode prema Lowryju je u reakciji amino skupina peptidne veze s ionima bakra u lužnatim uvjetima i oksidaciji fenolnih skupina bočnog ogranka aromatskih aminokiselina tirozin (Tyr) i triptofan (Trp), koje kao posljedicu imaju redukciju reagensa Folin-Ciocalteu (Dunn, 1992) pri čemu nastaje kompleks plavo-ljubičastog obojenja s apsorpcijskim maksimumom pri 660-700 nm (Slika 21). Folin-Ciocalteu reagens sadrži fosfovolframatnu i fosfomolibdensku kiselinu koje bakreni ioni, koordinirano vezani na amino skupine peptidne veze, i fenolna skupina aminokiseline Tyr reduciraju u volfram i molibden plavilo.



Slika 21. Princip metode određivanja koncentracije proteina u uzorcima prema Lowryju (1951).

a. Koordinativna veza iona bakra s četiri dušikova atoma peptidne veze; **b.** Hidroksilna skupina aminokiseline tirozin u proteinu.

Bakreni ioni koordinirano vezani na aminoskupine peptidne veze i fenolna skupina tirozina reduciraju fosfovolframatnu i fosfomolibdensku kiselinu Folinovog reagensa u volfram i molibden plavilo.

Lowryjeva metoda osjetljiva je dovoljno za određivanje vrlo malih koncentracija proteina, 0,10 - 2 mg/mL (Dunn, 1992), tj. 0,005 – 0,10 mg/ml (Price, 1996). Glavni nedostatak ove metode je njezina osjetljivost na promjene pH, tj. vrlo uzak raspon pH vrijednosti unutar kojeg daje točne rezultate mjerenja. Upravo zato se predlaže korištenje vrlo malih volumena uzorka kako bi se što manje djelovalo na pH reakcijske smjese.

Kemikalije

- HCl (Kemika, Hrvatska): 0,1 M otopina
- Goveđi serumski albumin (BSA, engl. *Bovine Serum Albumin*) (Sigma Aldrich, SAD): 0,5% otopina
- ABC otopina:
 - Na₂CO₃ (Kemika, Hrvatska): 2%-tna otopina
 - CuSO₄ (Kemika, Hrvatska): 1%-tna otopina
 - K-Na tartarat (Kemika, Hrvatska): 2%-tna otopina
- Reagens Folin-Ciocalteu (Sigma Aldrich, SAD)
- Fiziološka otopina: 9%-tna otopina NaCl (Kemika, Hrvatska)

Postupak

Određivanje koncentracije proteina napravljeno je u triplikatu koristeći seriju otopina BSA u 200 µl 0,1 M HCl različitih koncentracija (Tablica 7) kao standarde.

Tablica 7. Priprema standardnih otopina goveđeg serumskog albumina (BSA).

Standardni niz	S ₁	S ₂	S ₃	S ₄
Koncentracija proteina BSA (g/l)	0,625	1,25	2,5	5

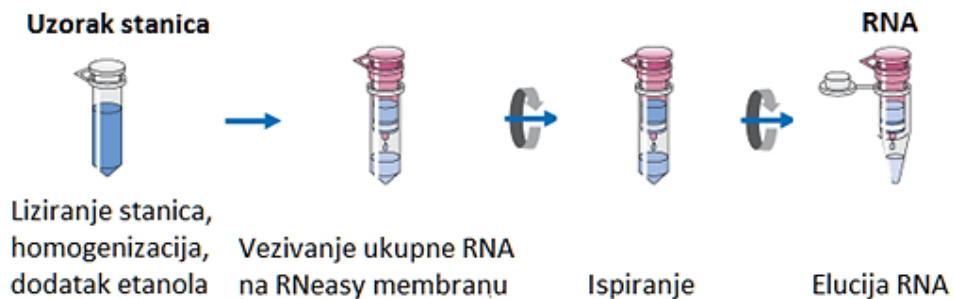
U staklene epruvete dodano je po 10 µl pripremljenih standarda, 10 µl 0,1 M HCl kao negativna kontrola ili 10 µl plazme koja je prethodno razrijeđena s fiziološkom otopinom 30 puta. U svaku od epruveta (standarde, negativnu kontrolu i uzorke plazme) dodano je po 2 ml ABC otopine. Nakon inkubacije od 10 min na sobnoj temperaturi u sve epruvete dodano je 200 µl reagensa Folin-Ciocalteu razrijeđenog vodom u omjeru 1:1. Nakon inkubacije od 30 minuta, spektrofotometrijski je izmjerena apsorbancija smjese pri valnoj duljini od 700 nm. Iz apsorbancije smjese, a prema apsorbanciji poznatih koncentracija proteina u standardima, izračunata je koncentracija proteina u svim uzorcima plazme.

Prosječna koncentracija proteina u svim uzorcima plazme iznosila je 0,08 ± 0,02 mg/ml (25.-75. percentil = 0,07-0,09 mg/ml; raspon = 0,03-0,14 mg/ml).

3.7. Izdvajanje RNA iz mononuklearnih stanica periferne krvi

Temeljni uvjet za analizu ekspresije gena je izolacija i priprema RNA visoke čistoće i integriteta. Za izolaciju ukupne RNA iz mononuklearnih stanica periferne krvi korišten je komercijalno dostupan komplet tvrtke Qiagen (SAD), miRNeasy Mini Kit. Ovaj komplet omogućava izdvajanje ukupne RNA iz uzoraka, uključujući i miRNA i drugih malih RNA molekula, a kombinira metodu liziranja stanica baziranu na fenol/gvanidin tretmanu te purifikaciju ukupne izolirane RNA putem silikatnih membrana.

Najveći problem u postupku izolacije intaktne RNA čini kontaminacija s ribonukleazama (RNaze), vrlo aktivnim i stabilnim enzimima koji razgrađuju RNA. Zato je preduvjet za uspješnu izolaciju RNA inaktivacija ribonukleaza prisutnih na laboratorijskom priboru i u standardnim kemikalijama. Ovaj komplet u sebi sadrži monofaznu otopinu fenola i gvanidin tiocianata (QIAzol reagens za lizu) koja olakšava lizu stanica, inhibira RNaze te pridonosi uklanjanju većine stanične DNA i proteina iz lizata organskom ekstrakcijom. Postupak izolacije RNA ovim kompletom započinje homogenizacijom uzoraka u QIAzol reagensu za lizu, nakon čega slijedi dodavanje kloroforma i razdvajanje homogenata u vodenu i organsku fazu centrifugiranjem (Slika 22). RNA se odvaja u gornji vodeni sloj, DNA ostaje u interfazi, a proteini u donjoj organskoj fazi i interfazi. Gornji vodeni sloj se izdvaja i dodaje se etanol kako bi se postigli uvjeti potrebni za vezivanje RNA (Slika 22). Takav uzorak se zatim stavlja na RNeasy Mini spin kolonu gdje se RNA veže za membranu, a fenol i ostatak uzorka se ispire (Slika 22). U konačnici se RNA eluira pomoću vode bez RNaza (Slika 22).



Slika 22. Postupak izdvajanja ukupne RNA pomoću komercijalnog kompleta miRNeasy Mini Kit (Qiagen, SAD).

Preuzeto i prilagođeno od: Qiagen, SAD

(<http://www.sabiosciences.com/pathwaymagazine/pcrhandbook/qiagen-rneasy-kits.php>)

Kemikalije

- Komercijalno dostupan komplet za izolaciju ukupne RNA iz uzoraka tvrtke Qiagen (SAD), miRNeasy Mini Kit:
 - QIAzol reagens za liziranje uzoraka (engl. *QIAzol Lysis Reagent*): sadrži soli gvanidina (50 ml)
 - Pufer RWT: sadrži soli gvanidina; pufer je koncentriran i prije uporabe ga treba razrijediti dodavanjem dva volumena etanola (96-100%)
 - Pufer RPE: pufer je koncentriran i prije uporabe ga treba razrijediti dodavanjem četiri volumena etanola (96-100%)
 - Voda bez RNaza (engl. *Rnase-Free Water*)
(Kit dodatno sadrži i potrebne RNeasy® Mini Spin kolone, tubice za skupljanje volumena 1,5 ml i 2 ml.)
- Kloroform (Kemika, Hrvatska)
- Etanol (Kemika, Hrvatska): 100%-tna i 96%-tna otopina

Postupak

Izolaciju RNA iz uzoraka mononuklearnih stanica periferne krvi napravljena je prema uputama proizvođača, koristeći protokol namijenjen pročišćavanju ukupne RNA iz animalnih stanica (Slika 20). Uzorci mononuklearnih stanica periferne krvi prethodno su bili spremljeni na -80°C dok se nije pristupilo RNA izolaciji. Koncentracija stanica u uzorcima bila je manja od 1×10^7 , prema preporuci proizvođača.

Stanice su prvo lizirane dodatkom QIAzol reagensa za lizu (700 μl) uz miješanje na vorteks miješalici 1 min i pipetiranje kako bi se talog što bolje razbio. Mikroeprevete s homogenatom zatim su ostavljene 5 min na sobnoj temperaturi kako bi se potaknulo odvajanje nukleoproteinskih kompleksa. Nakon inkubacije na sobnoj temperaturi u svaku mikroeprevetu dodano je 140 μl kloroforma i mikroeprevete su snažno promiješane treskanjem u trajanju od oko 15 s. Nakon inkubacije od 2-3 min na sobnoj temperaturi uzorci su centrifugirani 15 min na 12000 x g (4°C) kako bi se razdvojile tri faze: gornja vodena faza koja sadrži RNA (bezbojna), bijela interfaza i donja organska faza (crvene boje). Volumen dobivene vodene faze (oko 350 μl) prebačen je u novu mikroeprevetu za sakupljanje na koju je dodano oko 1,5 volumena 100%-tnog etanola (oko 525 μl), a uzorci su dobro promiješani pomoću pipete. 700 μl uzorka prebačeno je u RNeasy Mini spin kolonu koja je smješтана u novu mikroeprevetu za sakupljanje. RNeasy Mini spin kolona je zajedno s mikroeprevetom za sakupljanje centrifugirana 15 s na 8000 x g (sobna temperatura), sve što je prošlo u mikroeprevetu za sakupljanje je bačeno, a centrifugiranje je zatim još jedan put ponovljeno pri istim uvjetima. Na kolonu je dodano 700 μl RWT pufera i centrifugiranje je ponovljeno kao u prethodnom koraku kako bi se kolona isprala. Zatim je na kolonu dodano 500 μl RPE pufera i centrifugiranje je ponovljeno, ali ovaj put u trajanju od 2 min. Ovim korakom se suši kolona kako bi se riješili zaostalog etanola koji bi nam mogao smetati u daljnjim koracima elucije RNA. Kolona je prebačena u novu mikroeprevetu za sakupljanje od 1,5 ml i na nju je dodano 50 μl vode bez RNaze te

su mikroeprovete s kolonama centrifugirane 1 min na 8000 x g (sobna temperatura) kako bi se eluirala RNA. Ovaj zadnji korak je još jednom ponovljen kako bi se dobila veća količina RNA.

Koncentracija dobivene RNA određena je mjerenjem apsorbancije razrijeđenog uzorka pri valnoj duljini od 260 nm (OD_{260}) pomoću uređaja NanoDrop 2000c UV-Vis Spectrophotometer (Thermo Scientific, SAD). Koncentracija RNA u otopini ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) izračunata je prema Formuli (1).

$$c(\text{RNA}) = OD_{260} \times 40 \times \text{čimbenik razrjeđenja}$$

(1)

Za određivanje čistoće RNA, tj. za određivanje stupnja zagađenja proteinima mjeri se i apsorbancija na 280 nm (OD_{280}) te se računa omjer OD_{260}/OD_{280} . Omjer veći od 1,8 upućuje na to da je izolirana RNA čista. Kvaliteta izolirane RNA provjerena je pomoću sustava Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Inc., SAD).

3.8. Reverzna transkripcija izolirane mRNA u komplementarnu DNA

Izolirane molekule RNA ne mogu se koristiti kao kalup u PCR-u pa je potrebno napraviti reverznu transkripciju (obrnuto prepisivanje) izolirane RNA u njoj komplementarnu DNA (cDNA). Za reverznu transkripciju korišten je komercijalno dostupan komplet High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems®, SAD) koji je optimiziran za sintezu cDNA iz ukupne izolirane RNA, a omogućuje korištenje vrlo male početne koncentracije kalupa od 0,02 µg pa sve do 2 µg. Nakon sinteze, cDNA se može dalje umnožiti specifičnim početnicama bez organske ekstrakcije ili precipitacije etanolom. Za sintezu cDNA ovaj komplet sadrži enzim reverznu transkriptazu pod komercijalnim nazivom MultiScribe™ Reverse Transcriptase. Ovaj komercijalni komplet omogućuje sintezu cDNA koristeći oligo(dT), nasumične početnice ili početnice koje su specifične za gen od interesa. U reakciji su korištene oligo(dT) početnice dužine 15 nukleotida koje prijanjaju na poli-A repove prisutne na 3' kraju mRNA zbog čega dolazi do prepisivanja samo molekula mRNA u cDNA.

Kemikalije

- Komercijalno dostupan komplet High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit tvrtke Applied Biosystems® (SAD):
 - RT pufer: 10x koncentriran
 - RT nasumični heksameri: 10x koncentrirani
 - Mješavina deoksiribonukleotida (dNTP): 25x (100mM)
 - Reverzna transkriptaza MultiScribe™ RT: 50 U/µl
- Voda tretirana dietilpirokarbonatom (DEPC)
- Početnice Oligo(dT): 0,5 µg/µl

Postupak

Prije postupka prepisivanja (reverzna transkripcija) RNA u cDNA potrebno je pripremiti sve uzorke tako da koncentracija RNA u svakom od uzoraka bude 0,2 µg/µl u ukupnom volumenu od 10 µl (ukupno 2 µg RNA po uzorku). Neke od uzoraka potrebno je razrijediti pomoću DEPC-H₂O, a uzorke u kojima je koncentracija RNA premala treba uparavati i na taj način koncentrirati. Uzorci su prema potrebi uparavani na uređaju Concentrator 5301 (Eppendorf, UK). Pravilo koje vrijedi je da se uparavanjem od 1 min volumen otopine smanji za oko 1 µl.

Kada su uzorci pripremljeni napravljena je i mješavina za reverznu transkripciju u koju su prema uputama proizvođača i prema Tablici 8 dodani svi sastojci smjese u ukupnom volumenu od 10 µl tako da konačni volumen reakcijske smjese bude 20 µl. Umjesto nasumičnih heksamera korištene su početnice oligo(dT), koje nisu dio komercijalnog kompleta, kako bi omogućili umnažanje samo mRNA. Uvjeti reakcije navedeni su u Tablici 9, a za reverznu transkripciju korišten je uređaj 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems®, SAD).

Tablica 8. Sastav reakcijske smjese (2x) za metodu reverzne transkripcije.

Sastojak reakcijske smjese	Početna koncentracija	Konačna koncentracija	Volumen po reakciji/ μ l
RT pufer	10 x	1 x	2
dNTP mješavina	25 x	1 x	0,8
Oligo(dT) početnice	0,5 μ g/ μ l	0,025 μ g/ μ l	1
Reverzna transkriptaza MultiScribe™ RT	50 U/ μ l	2,5 U/ μ l	1
DEPC-H2O	-	-	5,2

dNTP, deoksiribonukleotidi; RT, reverzna transkripcija.

Tablica 9. Uvjeti reakcije za metodu reverzne transkripcije.

Faze reakcije	Temperatura	Vrijeme
Faza 1 (početni korak)	25°C	10 min
Faza 2 (reverzna transkripcija)	37°C	120 min
Faza 3 (razgradnja enzima)	85°C	5 min
Faza 4 (pohranjivanje uzoraka)	4°C	∞

3.9. Određivanje ekspresije gena za moždani neurotrofni čimbenik i sortirajući receptor prekursora peptida amiloid- β

PCR u stvarnom vremenu je metoda koja omogućuje određivanje ekspresije gena. Metoda se temelji na tome da tijekom umnažanja novonastala DNA biva obilježena fluorescencijskom bojom koja je dodana u reakcijsku smjesu i koja je specifična za dvolančanu DNA. Koristeći komercijalno dostupne uređaje moguće je pratiti količinu novosintetizirane DNA kroz cikluse mjerenjem emitirane fluorescencije koja je proporcionalna količini nastalog PCR produkta. PCR u stvarnom vremenu je metoda kojom se može kvantificirati genska ekspresija odabranog gena koristeći cDNA kao kalup u reakciji (količina cDNA odgovara početnoj količini mRNA koja je mjera ekspresije gena). Princip metode je taj da se za svaki analizirani gen prati fluorescencijski signal. Kada taj signal prijeđe razinu detekcije koja odgovara nespecifičnom signalu, tzv. prag fluorescencije (engl. *threshold*), smatra se da analizirani uzorak sadrži željenu cDNA koja se u trenutku prelaska praga nakon određenog broja ciklusa umnožila na razinu detekcije. Broj ciklusa reakcije koji je bio potreban da bi analizirani uzorak prešao prag fluorescencije naziva se Ct (engl. *threshold cycle*). Ovaj podatak zapravo govori kolika je bila početna količina cDNA, tj. mRNA u uzorku. Metoda relativne kvantifikacije uspoređuje količinu ekspresije istraživanog gena između pojedinih uzoraka, pri tome gen čija se ekspresija određuje naziva se ciljni gen (engl. *target*), a gen koji služi za normalizaciju rezultata interna kontrola (engl. *reference*). Uvijek je pri kvantifikaciji rezultata važno obratiti pozornost i na efikasnost same PCR reakcije (95-100%). U ovom radu analizirana je ekspresija gena BDNF i gena SORL1 u mononuklearnim stanicama periferne krvi kod osoba s dijagnozom AB-a i ispitanika kojima je dijagnosticiran MCI.

Kemikalije

- Komercijalno dostupan komplet tvrtke TaKaRa Bio (Japan), SYBR® *Premix Ex Taq II* (Tli RNase H Plus) (2x koncentriran):
 - Enzim TaKaRa Ex Taq HS
 - dNTP mješavina
 - Mg²⁺
 - Enzim Tli RNase H
 - Fluorescentna boja SYBR Green
- Početnice (Sigma Aldrich, SAD): 100 μ M (razrijeđene TE puferom na 10 μ M); scale 0,05 (Tablica 10)

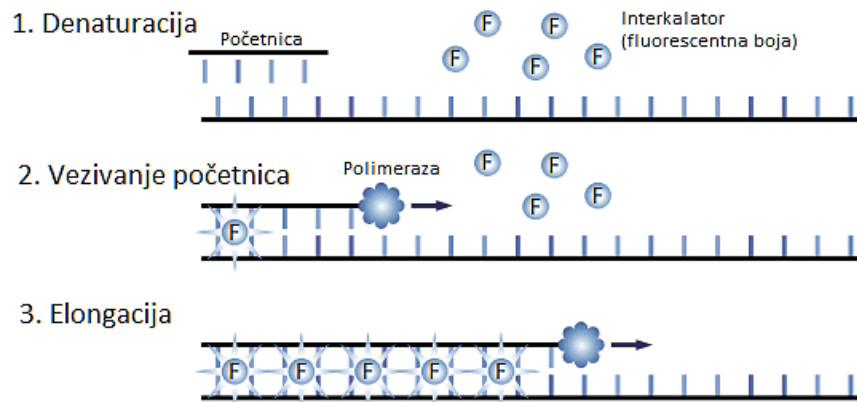
Tablica 10. Početnice korištene za određivanje ekspresije gena.

Gen	Početnica	5' → 3'
BDNF	Forward (uzvodna)	AAACATCCGAGGACAAGGTG
	Reverse (nizvodna)	AGAAGAGGAGGCTCCAAAGG
SORL1	Forward (uzvodna)	TTACTGGACGGATGCCTACC
	Reverse (nizvodna)	CGGAATATGCTGAGCTGTGA
β-aktin	Forward (uzvodna)	TCCCTGGAGAAGAGCTACGA
	Reverse (nizvodna)	AGGAAGGAAGGCTGGAAGAG

BDNF, moždani neurotrofni čimbenik; Forward, početnica koja se veže na 5' kraj DNA lanca; Reverse, početnica koja se veže na 3' kraj DNA lanca; SORL1, gen za sortirajući receptor proteina APP-a.

Postupak

Ekspresija gena određena je metodom PCR-a u stvarnom vremenu pomoću analizatora LightCycler v2.0 (LightCycler, Roche, Njemačka). Za određivanje ekspresije gena korišten je komplet SYBR® *Premix Ex Taq II* (Tli RNase H Plus) (TaKaRa Bio, Japan) koji vrlo dobro sprječava stvaranje parova početnica (engl. *primer-dimer*) i nespecifičnih produkata. Ovaj komplet sadrži i RNazu otpornu na visoke temperature (Tli RNase H Plus) koja vrlo uspješno razgrađuje ostatke mRNA koji se često mogu nalaziti zajedno s cDNA i mogu inhibirati reakciju PCR-a. Navedeni komplet koristi dodavanje interkalatora (SYBR Green I) koji emitira fluorescenciju kada se veže na dvolančanu DNA (Slika 23). Navedeni postupak omogućava detekciju umnažanja DNA mjerenjem fluorescencije.



Slika 23. Metoda detekcije umnažanja molekule DNA pomoću fluorescentnog interkalatora. Preuzeto i prilagođeno od: TaKaRa Bio (<http://www.clontech.com>)

Mješavina za PCR u stvarnom vremenu napravljena je prema uputama proizvođača (Tablica 11) u ukupnom volumenu od 18 μ l. U svaki uzorak dodano je 2 μ l kalupa (<100 ng) tako da konačni volumen reakcije bude 20 μ l. Uvjeti reakcije navedeni su u Tablici 12. Za sve umnažane gene napravljena je i negativna kontrola bez dodanog kalupa (NTC, engl. *Non Template Control*), a svaki uzorak je napravljen u duplikatu.

Tablica 11. Sastav reakcijske smjese za određivanje ekspresije gena.

Sastojak reakcijske smjese	Početna koncentracija	Konačna koncentracija	Volumen po reakciji/ μ l
SYBR® Premix Ex Taq II (Tli RNase H Plus)	2 x	1 x	10
Početnica: Forward (uzvodna)	10 μ M	0,4 μ M	0,8
Početnica: Reverse (nizvodna)	10 μ M	0,4 μ M	0,8
dH₂O	-	-	6,4

Forward, početnica koja se veže na 5' kraj DNA lanca; Reverse, početnica koja se veže na 3' kraj DNA lanca.

Tablica 12. Uvjeti reakcije određivanje ekspresije gena metodom lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu.

Faze reakcije	Temperatura	Vrijeme
	20°C/s	
Inicijalna denaturacija	1 ciklus	
	95°C	30 s
PCR	40 ciklusa	
	95°C	5 s
	60°C	20 s

PCR, lančana reakcija polimeraze.

3.10. Statistička obrada podataka

Statistička obrada rezultata napravljena je pomoću statističkog programa Sigma Stat 3,5 (Jandell Scientific Corp., SAD). Razina značajnosti α postavljena je na 0,05, a svi korišteni testovi bili su dvosmjerni. Klinički i demografski parametri (bodovi na psihometrijskim skalama, dob bolesnika, itd.) kao i koncentracija proteina BDNF u plazmi prikazani su kao medijan i interkvartilni raspon između 25. i 75. percentile. Kolmogorov-Smirnov test korišten je za utvrđivanje normalnosti razdiobe pojedinih parametara (demografskih, kliničkih, laboratorijskih).

Za usporedbu vrijednosti različitih istraživanih parametara korišteni su po potrebi parametrijski i neparametrijski testovi, ovisno o vrsti podataka i njihovoj razdiobi. U slučaju normalne razdiobe podataka za usporedbe između dvije skupine korišten je Studentov t-test, a u slučaju više uspoređivanih skupina jednosmjerna ANOVA nakon koje je po potrebi napravljen Tukeyjev test višestruke usporedbe. U većini slučajeva podaci nisu bili normalno distribuirani pa su korištene neparametrijske inačice navedenih testova. Kod usporedbe dvije grupe podataka korišten je Mann-Whitney U test, a kod usporedbe tri ili više skupina podataka neparametrijska Kruskal-Wallisova ANOVA rangova nakon koje je, u slučaju značajne povezanosti između pojedinih skupina, napravljena odgovarajuća post-hoc analiza kako bi se međusobno usporedile zasebne skupine (Conover, 1999).

Povezanost broja bodova na pojedinim psihometrijskim skalama i koncentracije proteina BDNF u plazmi određena je izračunavanjem Spearmanovog koeficijenta korelacije (r_s) jer je postojalo odstupanje od normalne razdiobe podataka. Za analize u kojima je bilo potrebno provjeriti utjecaj većeg broja nezavisnih varijabli na jednu zavisnu varijablu korištena je metoda višestruke linearne regresije ili dvosmjerna ANOVA.

Distribucija kategoričkih podataka, kao što su frekvencije genotipova i alela, uspoređena je između pojedinih skupina χ^2 -testom koji se također koristio za provjeru odstupanja distribucije genotipova od Hardy-Weinbergove ravnoteže. Kako bi se provjerilo koji od genotipova najviše doprinosi statističkoj značajnosti, izračunati su standardizirani reziduali i vrijednosti R.

U slučaju analize SNP biljega u obzir treba uzeti činjenicu da ovi biljezi u genomu nisu potpuno nezavisni. Tijekom rekombinacije genoma, prilikom nastanka spolnih stanica, dio biljega koji se nalaze jedan blizu drugoga češće se nasljeđuju zajedno od očekivanog. To znači da između njih postoji LD i oni nisu neovisni jedan od drugoga već govorimo o haplotipu, tj. kombinaciji alela koji se zajedno nasljeđuju. Kako bi provjerili da li su istraživani polimorfizmi u LD-u, tj. da li postoje određene kombinacije alela koje se češće zajedno nasljeđuju (haplotip) koristili smo program Haploview, verzija 4.2 (Broad Institute of Harvard and MIT, SAD) (Barrett i sur., 2005). Za određivanje LD-a koristi se standardizirani koeficijent D' . Vrijednosti D' iznad 0,80 označavaju da su dva istraživana polimorfizma u LD-u. Procjena parova haplotipova za svakog pojedinog ispitanika napravljena je pomoću programa PHASE, verzija 2.1.1 (University of Washington, SAD) koji koristi Bayesian statističku metodu za rekonstrukciju procijenjenih haplotipova iz podataka za pojedinu populaciju (Stephens i Donnelly, 2003; Stephens i sur., 2001). Smatra se da su računalni algoritmi

koje koristi program PHASE 2.1.1 superiorni u odnosu na druge metode za procjenu haplotipova kao što je npr. algoritam za maksimiziranje očekivanja (EM).

Kako bi se provjerilo postoji li povezanost stupnja demencije, koji je definiran prema skali CDR (zavisna varijabla), s različitim haplotipovima gena BDNF (nezavisna varijabla), korištena je metoda logističke regresije.

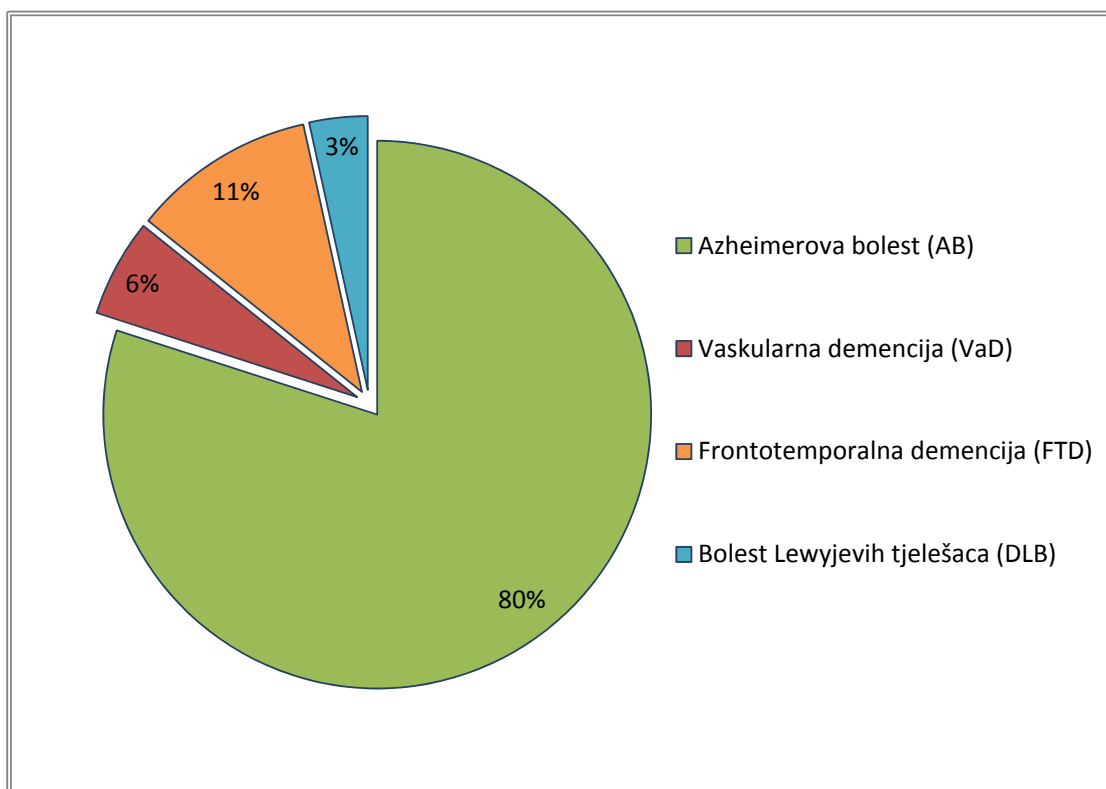
Za određivanje relativne mRNA ekspresije korištena je komparativna Ct metoda, $\Delta\Delta Ct$, (Livak i Schmittgen, 2001), a dobiveni podaci uspoređeni su t-testom zbog normalne razdiobe vrijednosti ekspresije analiziranih gena.

4. REZULTATI

4.1. Demografski podaci

U istraživanje je uključeno ukupno 318 ispitanika oba spola (47,1% muškaraca) koji su podijeljeni prema dijagnozi demencije na: ispitanike s dijagnozom AB-a (N=207), ispitanike kojima je dijagnosticiran DLB (N=9), ispitanike s dijagnozom FTD-a (N=28), ispitanike kojima je dijagnosticiran VaD (N=15) te ispitanike s dijagnozom MCI-a (N=59) (Slika 24).

Tablica 13 prikazuje demografske podatke ispitanika koji su podijeljeni prema dijagnozi. Između istraživanih skupina ne postoji značajna razlika u distribuciji prema spolu ($\chi^2=3,53$; $df=4$; $p=0,474$). Prema podacima iz Tablice 13 vidljivo je da su u svim skupinama skoro podjednako zastupljeni ispitanici muškog te ispitanice ženskog spola.



Slika 24. Udio pojedinih dijagnoza unutar istraživane skupine bolesnika.

Normalna distribucija svih demografskih varijabli testirana je Kolmogorov-Smirnovim testom. S obzirom na odstupanja od normalne distribucije, za analizu je korišten neparametrijski Kruskal-Wallisov test.

Između istraživanih skupina postoji statistički značajna razlika u dobi ($p \leq 0,001$) ispitanika (Tablica 13). Glavna razlika u dobi između istraživanih skupina proizlazi iz činjenice da je skupina ispitanika s AB-om starija od skupina kojima je postavljena dijagnoza FTD-a ili MCI-a (Tablica 13). Istraživane skupine značajno se razlikuju i u duljini trajanja obrazovanja ($p=0,033$).

Tablica 13. Demografski podaci ispitanika podijeljenih prema dijagnozi u ispitanike s blagim kognitivnim (spoznajnim) poremećajem i u ispitanike s različitim tipovima demencije.

Svi podaci su prikazani kao medijan (25.-75. percentil).

	Ispitanici podijeljeni prema dijagnozi					Kruskal-Wallis test df=4	
	MCI	AB	DLB	FTD	VaD	H	p
	N (% muškaraca)						
	61 (45,9)	214 (44,2)	9 (55,6)	28 (60,7)	16 (56,3)		
Dob /godine	70,0 (59,0-75,0)	75,0 ^{*,**} (70,0-83,2)	72,5 (67,0-75,0)	61,5 (58,5-68,5)	71,0 (66,0-76,0)	45,14	≤0,001
Obrazovanje /godine	13 (11,0-16,0)	12 (6,0-14,0)	8 (5-10)	12 (9,8-12,5)	13,5 (11,0-17,0)	10,50	0,033
MMSE	26,0 (24,0-27,0)	18,0 ^{*,†} (14,0-22,0)	18,5 (17,0-23,0)	17,5 [*] (11,0-20,0)	25,0 ^{**} (20,2-26,8)	82,21	≤0,001
CDT	9,0 (7,0-10,0)	6,0 [*] (5,0-7,5)	6,0 [*] (4,2-6,0)	5,5 [*] (4,0-6,2)	6,5 (6,0-10,0)	40,22	≤0,001
ADAS-Cog	11,0 (6,7-16,8)	29,0 [*] (17,8-38,5)	23,0 (9,3-29,8)	37,5 [*] (22,4-46,5)	9,8 ^{**} (7,0-26,9)	48,70	≤0,001
NPI	4,0 (0,0 – 16,0)	11,0 ^{*,†} (5,0 – 18,5)	4,0 (2,5 – 25,8)	9,0 (5,5 – 21,5)	0,0 ^{**} (0,0 – 4,0)	13,55	0,009

AB, Alzheimerova bolest; ADAS-Cog, skala procjene Alzheimerove bolesti - kognitivna podskala; CDT, test crtanja sata; DLB, bolest Lewyjevih tjelešaca; FTD, frontotemporalna demencija; MCI, blagi kognitivni (spoznajni) poremećaj; MMSE, test procjene mentalnog stanja; N, broj ispitanika; NPI, neuropsihijatrijski inventar; VaD, vaskularna demencija.

* p<0,05 vs ispitanici s MCI-om (post-hoc test)

** p<0,05 vs ispitanici s FTD-om (post-hoc test)

† p<0,05 vs ispitanici s VaD-om (post-hoc test)

Usporedba ispitanika s obzirom na broj bodova na pojedinim psihometrijskim testovima (Tablica 13), koji se koriste za procjenu kognitivnih sposobnosti u dijagnozi demencije, potvrđuje je da se istraživane skupine značajno razlikuju u broju bodova na testu MMSE ($p \leq 0,001$) i CDT ($p \leq 0,001$). Post hoc analiza potvrđuje značajnu razliku u broju bodova na testu MMSE između skupina ispitanika s dijagnozom AB-a ili MCI-a, između ispitanika s dijagnozom MCI-a ili FTD-a, između ispitanika kojima je dijagnosticiran VaD ili FTD te ispitanika s dijagnozom VaD-a u odnosu na one s dijagnozom AB-a (Tablica 13). U slučaju testa CDT, uočena razlika je posljedica značajno većeg broja bodova na testu kod ispitanika s dijagnozom MCI-a u odnosu na ispitanike kojima je dijagnosticiran AB, FTD ili DLB (Tablica 13).

Post hoc analiza potvrdila je značajnu razliku u broju bodova na ADAS-Cog testu između svih skupina ispitanika ($p \leq 0,001$) što je posljedica značajne razlike u broju bodova na ovoj skali između ispitanika s dijagnozom MCI-a u odnosu na ispitanike kojima je dijagnosticiran AB ili FTD, a potvrđena je i značajna razlika u broju bodova na ovoj skali između ispitanika s dijagnozom FTD-a u odnosu na one s VaD-om (Tablica 13). Između skupina postoji i razlika u ukupnom broju bodova na skali NPI ($p = 0,009$) koja je posljedica značajno većeg ukupnog broja bodova na NPI-u kod osoba s AB-om u odnosu na ispitanike s dijagnozom MCI-a te većeg broja bodova kod osoba kojima je dijagnosticiran AB ili FTD u odnosu na ispitanike s dijagnozom VaD-a (Tablica 13). Među istraživanim skupinama prisutna je i značajna razlika s obzirom na raspodjelu ispitanika prema skali CDR ($\chi^2 = 53,39$; $df = 16$; $p \leq 0,001$).

4.2. Koncentracija moždanog neurotrofnog čimbenika u plazmi

Koncentracija neurotrofina BDNF u plazmi određena je komercijalno dostupnim ELISA kompletom tvrtke R&D Systems, Inc. (SAD i Kanada). Dobiveni podaci su normalizirani s obzirom na koncentraciju ukupnih proteina u plazmi, zbog mogućnosti utjecaja različite koncentracije ukupnih proteina u uzorcima na dobivene rezultate metodom ELISA prilikom usporedbe dobivenih podataka. Konačna koncentracija proteina BDNF izražena je kao koncentracija proteina BDNF (ng/ml) podijeljena ukupnom koncentracijom proteina u uzorku (mg/ml).

Normalna razdioba vrijednosti koncentracije proteina BDNF u uzorcima testirana je Kolmogorov-Smirnovim testom. S obzirom na odstupanja od normalne razdiobe podataka, u svim analizama korišteni su neparametrijski testovi za statističku obradu podataka.

4.2.1. Demografske varijable (dob, spol, obrazovanje) i koncentracija moždanog neurotrofnog čimbenika u plazmi

Kako bi se provjerilo postoji li utjecaj dobi, spola ispitanika te duljine trajanja obrazovanja na koncentraciju proteina BDNF u plazmi, provedena je višestruka regresijska analiza za sve dijagnostičke skupine zajedno te zasebno za tri istraživane skupine (ispitanike s dijagnozom MCI-a, AB-a ili s dijagnozom drugih tipova demencija) s koncentracijom BDNF-a u plazmi kao zavisnom varijablom te dobi, spolom i obrazovanjem kao nezavisnim varijablama. Preporuka u slučaju ovakvih analiza je da broj ispitanika po skupini bude 10 do 20 puta veći nego broj testiranih varijabli. S obzirom da neke od istraživanih skupina nisu udovoljavale navedenom uvjetu (zbog malog broja ispitanika), nije napravljena analiza za sve pojedine tipove demencija (FTD, DLB i VaD) već su ti ispitanici zajedno uvršteni u skupinu demencija drugog tipa.

Model višestruke linearne regresije za sve ispitanike zajedno nije značajan (korigirani $R^2=0,000$; $F=0,52$; $p=0,669$), jer niti dob (koeficijent=0,255; $t=0,95$; $p=0,344$), niti spol (koeficijent=2,709; $t=0,54$; $p=0,592$), a niti duljina trajanja obrazovanja (koeficijent=-0,210; $t=-0,37$; $p=0,710$) nemaju značajan utjecaj na zavisnu varijablu (koncentracija proteina BDNF u plazmi). Rezultati višestruke linearne regresije za sve dijagnostičke skupine zasebno (Tablica 14) pokazuju da niti jedan od predikcijskih modela nije značajan, tj. niti jedna od testiranih zavisnih varijabli nema značajan utjecaj na koncentraciju proteina BDNF u istraživanim skupinama.

Tablica 14. Utjecaj dobi, spola i obrazovanja na koncentraciju moždanog neurotrofnog čimbenika u plazmi ispitanika oboljelih od demencije ili blagog kognitivnog (spoznajnog) poremećaja.

Dijagnoza	Koeficijent	t	p
MCI			
Dob	0,085	0,19	0,849
Spol	7,475	0,76	0,453
Obrazovanje	0,736	0,60	0,550
Višestruka linearna regresija	Korigirani $R^2=0,000$; $F=0,27$, $p=0,844$		
AB			
Dob	0,557	-0,27	0,786
Spol	3,302	0,44	0,664
Obrazovanje	-0,551	-0,70	0,489
Višestruka linearna regresija	Korigirani $R^2=0,000$; $F=0,85$, $p=0,472$		
Demencije drugog tipa			
Dob	-0,327	-0,53	0,600
Spol	-10,363	-1,05	0,302
Obrazovanje	-0,469	-0,37	0,717
Višestruka linearna regresija	Korigirani $R^2=0,000$; $F=0,45$, $p=0,716$		

AB, Alzheimerova bolest; BDNF, moždani neurotrofni čimbenik; MCI, blagi kognitivni (spoznajni) poremećaj.

Rezultati višestruke linearne regresije pokazuju da dob, spol te duljina obrazovanja ne utječu na vrijednosti koncentracije proteina BDNF u trima istraživanim skupinama pa su ove demografske varijable isključene iz svih daljnjih analiza (Tablica 14).

4.2.2. Koncentracija moždanog neurotrofnog čimbenika u plazmi ispitanika oboljelih od demencije ili blagog kognitivnog (spoznajnog) poremećaja

Analizirane vrijednosti koncentracije BDNF-a u plazmi značajno se razlikuju između skupina ispitanika oboljelih od različitih tipova demencije (AB, DLB, FTD, VaD) ili MCI-a ($p=0,007$) (Tablica 15). Navedena razlika posljedica je značajne razlike ($p<0,05$; post-hoc test) u koncentraciji BDNF-a u plazmi oboljelih od AB-a u odnosu na ispitanike s dijagnozom MCI-a ili FTD-a što je potvrđeno post-hoc testom (Conover, 1999).

Tablica 15. Koncentracija moždanog neurotrofnog čimbenika u plazmi ispitanika oboljelih od demencije ili blagog kognitivnog (spoznajnog) poremećaja.

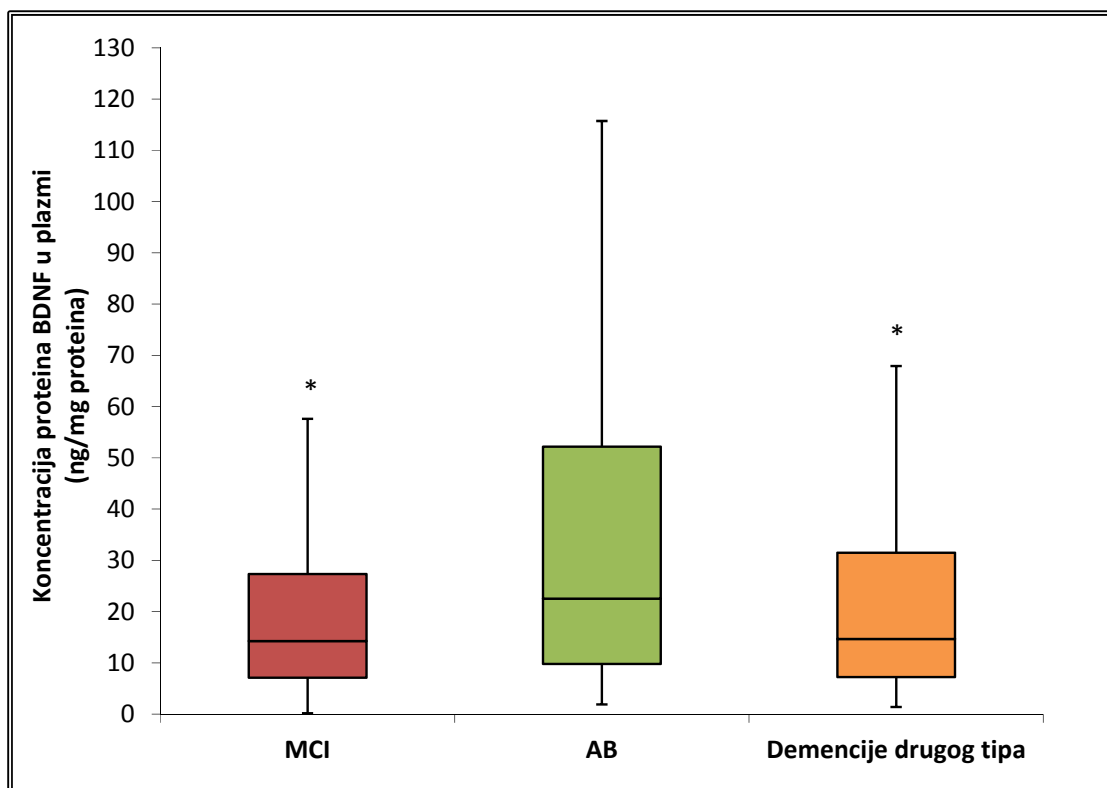
Svi podaci su prikazani kao medijan (25.-75. percentil).

Dijagnoza	N (% muškaraca)	Koncentracija proteina BDNF (ng/mg proteina)		
		medijan	Percentil	
			25.	75.
MCI	61 (45,9)	14,2	7,1	27,3
AB	214 (44,2)	22,5	9,8	52,2
DLB	9 (55,6)	10,2	6,7	44,3
FTD	28 (60,7)	11,1	6,7	26,7
VaD	16 (56,3)	21,3	10,0	64,0
Kruskal-Wallisov test		H=14,22; df=4; p=0,007		

* $p<0,05$ vs ispitanici s ABI-om (post-hoc test)

AB, Alzheimerova bolest; BDNF, moždani neurotrofni čimbenik; DLB, bolest Lewyjevih tjelešaca; FTD, frontotemporalna demencija; MCI, blagi kognitivni (spoznajni) poremećaj; N, broj ispitanika; VaD, vaskularna demencija.

Zbog malog broja ispitanika u skupinama s dijagnozama FTD-a, DLB-a i VaD-a ovi su ispitanici spojeni u jednu skupinu i napravljena je dodatna usporedba sa skupinama ispitanika kojima je dijagnosticiran AB ili MCI. Usporedba ovih triju skupina (Slika 25) pokazuje da se istraživane skupine značajno razlikuju prema koncentraciji BDNF-a u plazmi ($H = 11,53$; $df=2$; $p=0,003$) zbog značajno više ($p<0,05$; post-hoc test) koncentracije BDNF-a u plazmi ispitanika s dijagnozom AB-a u odnosu na skupinu ispitanika s demencijama drugog tipa i u odnosu na ispitanike s dijagnozom MCI-a (Slika 25).



Slika 25. Grafički prikaz koncentracije moždanog neurotrofnog čimbenika (BDNF) u plazmi ispitanika s dijagnozom blagog kognitivnog (spoznajnog) poremećaja (MCI), ispitanika s dijagnozom Alzheimerove bolesti (AB) i ispitanika s dijagnozom ostalih tipova demencija.

Središnji pravokutnik predstavlja vrijednosti od donjeg do gornjeg kvartila (od 25. do 75. percentila), a središnja linija predstavlja medijan. Horizontalne linije se pružaju od minimalne do maksimalne vrijednosti.

* $p < 0,05$ vs. AB (post-hoc test)

S obzirom na odstupanja od normalne razdiobe podataka, za potvrdu rezultata napravljena je transformacija podataka vezanih za vrijednosti koncentracije BDNF-a u plazmi koristeći funkciju logaritmiranja (\ln , prirodni logaritam) čime su zadovoljeni preduvjeti za korištenje parametrijske statistike. Analiza transformiranih podataka potvrđuje rezultate dobivene neparametrijskim statističkim metodama. Rezultati ANOVA-e pokazuju da postoji značajna razlika u koncentraciji BDNF-a u plazmi kada se uspoređi svih pet dijagnostičkih skupina ($F=4,50$; $df=4,313$; $p=0,002$), a dobivena razlika posljedica je značajno više koncentracije BDNF-a u plazmi pacijenata s AB-om u odnosu na one kojima je dijagnosticiran MCI ($p=0,006$; Tukeyjev test) ili FTD ($p=0,030$; Tukeyjev test). Usporedba transformiranih vrijednosti koncentracije BDNF-a između skupine s dijagnozom AB-a, MCI-a te kombinirane skupine s dijagnozom ostalih tipova demencija potvrđuje ostale rezultate i potvrđuje značajnu razliku između navedenih skupina ($F=7,58$; $df=2, 315$; $p < 0,001$). Spomenuta razlika je ponovo posljedica više koncentracije BDNF-a u plazmi pacijenata s AB-om u odnosu na ispitanike s dijagnozom MCI-a ($p=0,002$; Tukeyjev test) ili ostalih tipova demencija ($p=0,029$; Tukeyjev test).

4.2.3. Koncentracija moždanog neurotrofnog čimbenika u plazmi i kognitivni simptomi demencije

Za procjenu kognitivnih oštećenja kod ispitanika s dijagnozom demencije ili s dijagnozom MCI-a korišteni su psihometrijski testovi:

- MMSE
- CDT
- ADAS-Cog
- CDR

Normalna razdioba podataka vezanih za broj bodova na pojedinim psihometrijskim testovima za sve skupine ispitanika, kao i vrijednosti koncentracije proteina BDNF u uzorcima, testirana je Kolmogorov-Smirnovim testom. S obzirom na odstupanja od normalne razdiobe, u svim analizama korišteni su neparametrijski testovi za statističku obradu podataka.

4.2.3.1. Demografske varijable (dob, spol, obrazovanje) i kognitivni simptomi demencije

Kako bi se provjerilo postoji li utjecaj dobi, spola ispitanika te duljine trajanja obrazovanja na kognitivne simptome demencije provedena je višestruka regresijska analiza za tri istraživane skupine (ispitanike s dijagnozom MCI-a, AB-a ili s dijagnozom drugih tipova demencija) s vrijednostima broja bodova na pojedinim psihometrijskim skalama (MMSE, ADAS-Cog, CDT ili CDR) kao zavisnom varijablom te dobi, spolom i obrazovanjem kao nezavisnim varijablama (Tablica 16).

Dobiveni rezultati (Tablica 16) pokazuju da niti jedan od predikcijskih modela nije značajan, tj. niti jedna od testiranih zavisnih varijabli nema značajan utjecaj na koncentraciju proteina BDNF u istraživanim skupinama. Rezultati višestruke linearne regresije potvrđuju da dob, spol te duljina obrazovanja ne utječu značajno na vrijednosti koncentracije proteina BDNF u trima istraživanim skupinama zbog čega se ove demografske varijable mogu isključiti iz svih daljnjih analiza.

Tablica 16. Utjecaj dobi, spola i obrazovanja na kognitivne simptome demencije kod ispitanika oboljelih od demencije ili blagog kognitivnog (spoznajnog) poremećaja.

Dijagnoza	MMSE			CDT			ADAS-Cog			CDR		
	Koeficijent	t	p	Koeficijent	t	p	Koeficijent	t	p	Koeficijent	t	p
MCI												
Dob	-0,007	-0,24	0,811	0,006	0,23	0,822	0,071	0,46	0,651	0,010	-0,65	0,524
Spol	0,439	0,67	0,504	-0,092	-0,17	0,868	-0,686	-0,22	0,827	-0,227	-1,47	0,161
Obrazovanje	0,132	1,51	0,140	0,068	1,00	0,323	-0,7467	-1,84	0,077	-0,013	-0,72	0,484
Višestruka linearna regresija	Korigirani $R^2=-0,011$; $F=0,84$; $p=0,481$			Korigirani $R^2=-0,036$; $F=0,46$; $p=0,710$			Korigirani $R^2=-0,016$; $F=1,16$; $p=0,344$			Korigirani $R^2=-0,033$; $F=0,80$; $p=0,094$		
AB												
Dob	0,132	1,84	0,070	-0,017	-0,51	0,614	-0,109	-0,39	0,695	-0,012	-1,08	0,288
Spol	0,616	0,56	0,576	0,137	2,57	0,012	-3,978	-0,91	0,365	-0,137	-0,76	0,453
Obrazovanje	0,259	2,26	0,026	0,137	0,47	0,639	-0,744	-1,73	0,088	-0,026	-1,56	0,127
Višestruka linearna regresija	Korigirani $R^2=0,052$; $F=0,27$; $p=0,053$			Korigirani $R^2=0,046$; $F=2,44$; $p=0,070$			Korigirani $R^2=0,005$; $F=1,16$; $p=0,349$			Korigirani $R^2=-0,009$; $F=1,13$; $p=0,347$		
Demencije drugog tipa												
Dob	0,061	0,40	0,691	-0,046	-0,79	0,437	-0,988	-1,95	0,066	-0,034	-0,81	0,435
Spol	-0,093	-0,29	0,771	0,012	0,10	0,918	-0,919	-0,80	0,435	-0,338	-0,55	0,591
Obrazovanje	-0,242	-0,10	0,922	-0,921	-1,00	0,327	-8,922	-1,07	0,298	-0,030	-0,35	0,732
Višestruka linearna regresija	Korigirani $R^2=-0,083$; $F=0,13$; $p=0,942$			Korigirani $R^2=-0,027$; $F=0,71$; $p=0,556$			Korigirani $R^2=0,076$; $F=1,57$; $p=0,230$			Korigirani $R^2=-0,173$; $F=0,31$; $p=0,816$		

AB, Alzheimerova bolest; ADAS-Cog, skala procjene Alzheimerove bolesti- kognitivna podskala; CDR, skala za rangiranje demencije; CDT, test crtanja sata; MCI, blagi kognitivni (spoznajni) poremećaj; MMSE, test procjene mentalnog stanja.

4.2.3.2. Koncentracija moždanog neurotrofnog čimbenika u plazmi i test procjene mentalnog stanja

Povezanost broja bodova na testu MMSE i koncentracije proteina BDNF u plazmi svih uzoraka, bez obzira na dijagnozu, određena je izračunavanjem Spearmanovog koeficijenta korelacije (r_s) jer je raspodjela podataka značajno odstupala od normalne razdiobe. Na isti način određena je i povezanost ovih dvaju varijabli zasebno kod ispitanika s dijagnozom AB-a, ispitanika s dijagnozom ostalih tipova demencija i ispitanika kojima je postavljena dijagnoza MCI-a. Rezultati pokazuju da nema značajne korelacije između broja bodova na testu MMSE i koncentracije BDNF-a u plazmi kod svih ispitanika zajedno ($r_s=-0,12$; $p=0,061$), a isti trend je vidljiv i kada podijelimo ispitanike prema dijagnozi (Tablica 17).

Tablica 17. Korelacija koncentracije moždanog neurotrofnog čimbenika u plazmi ispitanika oboljelih od demencije ili blagog kognitivnog (spoznajnog) poremećaja i broja bodova na testu procjene mentalnog stanja.

Dijagnoza	r_s	p
MCI	-0,06	0,709
AB	-0,14	0,086
Demencije drugog tipa	0,16	0,322

AB, Alzheimerova bolest; MCI, blagi kognitivni (spoznajni) poremećaj.

Kako bi dodatno ispitali povezanost kognitivnih simptoma, određenih prema broju bodova na testu MMSE, i koncentracije BDNF-a u plazmi, svi ispitanici su prema broju MMSE bodova podijeljeni na 4 skupine:

- osobe s normalnim kognitivnim sposobnostima (broj bodova od 27 do 30),
- osobe s blagom demencijom (broj bodova od 21 do 26) – rana faza demencije;
- osobe s umjerenom demencijom (broj bodova od 10 do 20) – srednja faza demencije;
- osobe s teškim oblikom demencije (broj bodova < 10) – kasna faza demencije.

Ispitanici s dijagnozom MCI-a nalaze se u skupini osoba s normalnim kognitivnim sposobnostima i u skupini osoba s blagom demencijom.

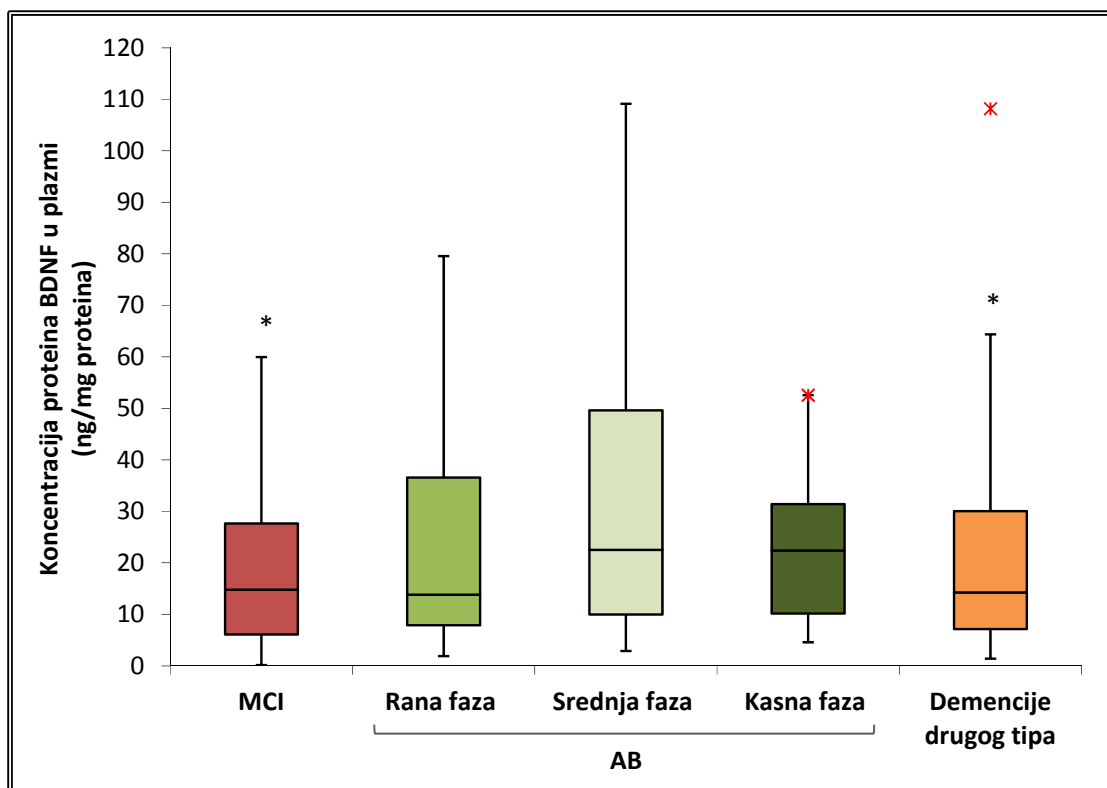
Usporedba je napravljena između svih ispitanika zajedno ($H=3,53$; $df=3$; $p=0,317$) i unutar pojedinih skupina ispitanika podijeljenih s obzirom na dijagnozu na ispitanike s AB-om, ispitanike s demencijama drugog tipa i ispitanike s MCI-em (Tablica 18). Rezultati pokazuju da nema povezanosti koncentracije BDNF-a u plazmi s razinom kognitivnog oštećenja procijenjenog pomoću testa MMSE unutar dijagnostičkih kategorija (MCI, AB i demencije drugog tipa) (Tablica 18).

Tablica 18. Koncentracija moždanog neurotrofnog čimbenika u plazmi ispitanika oboljelih od demencije ili blagog kognitivnog (spoznajnog) poremećaja prema broju bodova na testu procjene mentalnog stanja. Svi podaci su prikazani kao medijan (25.-75. percentil).

Dijagnoza	MMSE bodovi				Kruskal-Wallisov test		
	<10	10-20	21-26	27-30	H	df	p
MCI	-	-	15,8 (6,2 – 27,4)	8,7 (3,9 – 36,6)	0,05	1	0,831
AB	22,4 (10,2 – 31,4)	22,5 (9,9 – 49,6)	13,8 (7,9 – 36,5)	-	3,19	2	0,203
Demencije drugog tipa	14,3 (10,2 – 24,7)	9,3 (5,8 – 26,9)	19,1 (7,7 – 30,0)	-	1,88	2	0,390

AB, Alzheimerova bolest; MCI, blagi kognitivni (spoznajni) poremećaj.

Unatoč tome što nema značajne korelacije koncentracije BDNF-a s brojem bodova na testu MMSE u istraživanim skupinama pacijenata (Tablica 18), vidljiv je trend povezanosti ovih dvaju varijabli kod pacijenata s AB-om. Stoga je napravljena dodatna usporedba skupine ispitanika s AB-om, koji su podijeljeni na kategorije prema broju MMSE bodova, i skupina ispitanika s MCI-em ili dijagnozom ostalih tipova demencija (koje nisu dodatno podijeljene na kategorije prema broju MMSE bodova). Usporedba upućuje na granično značajnu razliku u vrijednostima koncentracije proteina BDNF između navedenih skupina ($H=9,45$; $df=4$; $p=0,050$) što je posljedica značajne razlike ($p<0,050$; post-hoc test) u koncentraciji proteina BDNF u plazmi pacijenata u srednjoj fazi AB-a (osobe s umjerenom demencijom) u odnosu na pacijente s dijagnozom MCI-a ili s dijagnozom ostalih tipova demencija (Slika 26).



Slika 26. Grafički prikaz koncentracije moždanog neurotrofnog čimbenika (BDNF) u plazmi ispitanika s dijagnozom blagog kognitivnog (spoznajnog) poremećaja (MCI), ispitanika s demencijama drugog tipa te ispitanika s dijagnozom Alzheimerove bolesti (AB) koji su dodatno podijeljeni, prema broju bodova na testu procjene mentalnog stanja, na bolesnike u ranoj, srednjoj i kasnoj fazi bolesti.

Središnji pravokutnik predstavlja vrijednosti od donjeg do gornjeg kvartila (od 25. do 75. percentila), a središnja linija predstavlja medijan. Horizontalne linije se pružaju od minimalne do maksimalne vrijednosti (vrijednosti koje odstupaju (tzv. „outside“ i „far out“ vrijednosti) prikazane su kao izdvojene točke).

* $p < 0,05$ vs. AB (post-hoc test)

Za dodatnu potvrdu rezultata analizirane su transformirane vrijednosti koncentracije BDNF-a u plazmi. Rezultati ANOVA-e pokazuju da postoji značajna razlika u koncentraciji BDNF-a u plazmi kada se usporede skupine ispitanika s dijagnozom MCI-a, ispitanika s dijagnozom AB-a (koji su dodatno podijeljeni prema broju bodova na testu MMSE na bolesnike u ranoj, srednjoj i kasnoj fazi bolesti) i ispitanika s dijagnozom ostalih tipova demencija ($F=3,07$; $df=4,238$; $p=0,017$). Uočena razlika je posljedica značajno više koncentracije BDNF-a u plazmi pacijenata u srednjoj fazi AB-a u odnosu na one kojima je dijagnosticiran MCI ($p=0,019$; Tukeyjev test). U slučaju pacijenata s demencijama drugog tipa vidi se sličan trend, ali razlika nije statistički značajna ($p=0,087$; Tukeyjev test).

4.2.3.3. Koncentracija moždanog neurotrofnog čimbenika u plazmi i test crtanja sata

Povezanost broja bodova na testu CDT i koncentracije proteina BDNF u plazmi svih uzoraka, bez obzira na dijagnozu, određena je izračunavanjem Spearmanovog koeficijenta korelacije (r_s) jer je raspodjela podataka značajno odstupala od normalne razdiobe. Na isti način određena je i povezanost ovih dvaju varijabli zasebno kod ispitanika s dijagnozom AB-a, ispitanika s dijagnozom ostalih tipova demencija i ispitanika kojima je postavljena dijagnoza MCI-a. Rezultati pokazuju da nema značajne korelacije između broja bodova na testu CDT u odnosu na koncentraciju BDNF-a u plazmi kod svih ispitanika zajedno ($r_s=-0,02$; $p=0,823$), a isti trend je vidljiv i kada podijelimo ispitanike prema dijagnozi (Tablica 19). Međutim, unutar skupine demencija drugog tipa postoji značajna i pozitivna korelacija ($p=0,028$) između koncentracije proteina BDNF u plazmi i broja bodova na CDT-u.

Tablica 19. Korelacija koncentracije moždanog neurotrofnog čimbenika u plazmi ispitanika oboljelih od demencije ili blagog kognitivnog (spoznajnog) poremećaja i broja bodova na testu crtanja sata.

Dijagnoza	r_s	p
MCI	-0,06	0,684
AB	-0,10	0,324
Demencije drugog tipa	0,34	0,028

AB, Alzheimerova bolest; MCI, blagi kognitivni (spoznajni) poremećaj.

Kako bi dodatno ispitali povezanost kognitivnih simptoma, određenih prema broju bodova na testu CDT, i koncentracije BDNF-a u plazmi, svi ispitanici su prema metodi koju je predložio Sunderland sa suradnicima (1989) podijeljeni na osobe s brojem bodova $CDT \leq 5$ (veće kognitivno oštećenje) i ispitanike s brojem bodova $CDT > 5$ (slabije kognitivno oštećenje). Većina ispitanika (90,4%) s dijagnozom MCI-a nalazi se u skupini osoba sa slabijim kognitivnim oštećenjem ($CDT > 5$).

Usporedba je napravljena između svih ispitanika zajedno ($U=4745,00$; $p=0,659$) i unutar pojedinih skupina ispitanika podijeljenih s obzirom na dijagnozu na ispitanike s AB-om, ispitanike s demencijama drugog tipa i ispitanike s MCI-em (Tablica 20).

Tablica 20. Koncentracija moždanog neurotrofnog čimbenika u plazmi ispitanika oboljelih od demencije ili blagog kognitivnog (spoznajnog) poremećaja prema broju bodova na testu crtanja sata.

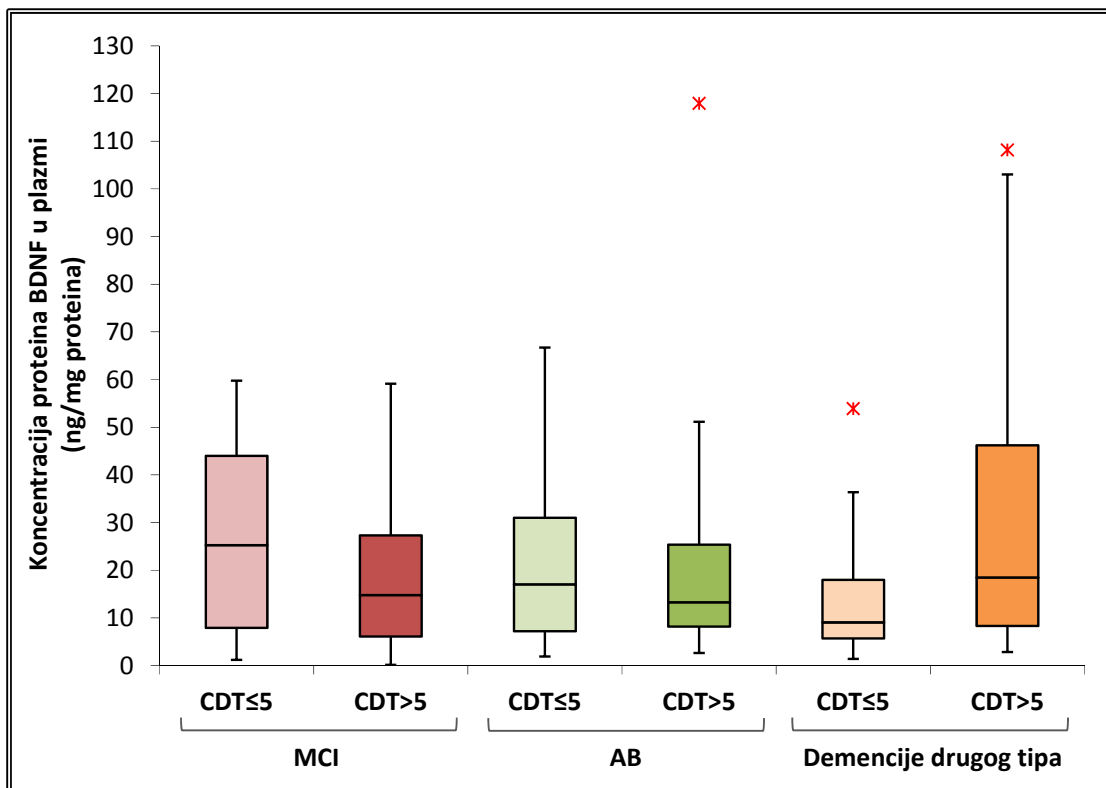
Svi podaci su prikazani kao medijan (25.-75. percentil).

Dijagnoza	CDT bodovi		Mann-Whitney U test	
	≤5	>5	U	p
MCI	25,3 (7,9 – 44,0)	14,8 (6,1 – 27,3)	99,00	0,566
AB	17,0 (7,2 – 31,0)	13,3 (8,2 – 25,4)	1314,00	0,601
Demencije drugog tipa	9,1 (5,7 – 18,0)	18,4 (8,3 – 46,2)	114,00	0,015

AB, Alzheimerova bolest; CDT, test crtanja sata; MCI, blagi kognitivni (spoznajni) poremećaj.

Rezultati pokazuju da nema povezanosti koncentracije BDNF-a u plazmi s razinom kognitivnog oštećenja procijenjenog pomoću testa CDT unutar dijagnostičkih kategorija AB i MCI, ali je ta povezanost značajna u skupini demencija drugog tipa (Tablica 20). Za dodatnu potvrdu značajnog rezultata u slučaju skupine demencija drugog tipa analizirane su transformirane vrijednosti koncentracije BDNF-a u plazmi. Rezultati t-testa pokazuju da postoji statistički značajna razlika ($t = -2,668$; $df = 39$; $p = 0,011$) u koncentraciji BDNF-a u plazmi kada se usporede ispitanici s dijagnozama ostalih tipova demencija koji su dodatno podijeljeni prema broju bodova na testu CDT.

Dodatna usporedba skupina ispitanika s AB-om, s MCI-em ili dijagnozom ostalih tipova demencija, koje su podijeljene na kategorije prema broju CDT bodova, potvrđuje da nema statistički značajne razlike u vrijednostima koncentracije proteina BDNF kada se sve skupine međusobno usporede ($H = 7,43$; $df = 5$; $p = 0,190$) (Slika 27) unatoč tome što je i dalje vidljiv trend niže koncentracije BDNF-a u plazmi kod skupine ispitanika s dijagnozom demencija drugog tipa koji se nalaze u skupini s težim kognitivnim oštećenjem ($CDT \leq 5$) u odnosu na skupinu sa slabijim kognitivnim oštećenjem ($CDT > 5$).



Slika 27. Grafički prikaz koncentracije moždanog neurotrofnog čimbenika (BDNF) u plazmi ispitanika s dijagnozom blagog kognitivnog (spoznajnog) poremećaja (MCI), ispitanika s dijagnozom Alzheimerove bolesti (AB) i ispitanika s demencijama drugog tipa koji su svi dodatno podijeljeni prema broju bodova na testu crtanja sata (CDT) na osobe s brojem bodova ≤ 5 (veće kognitivno oštećenje) i ispitanike s brojem bodova $>0,5$ (slabije kognitivno oštećenje).

Središnji pravokutnik predstavlja vrijednosti od donjeg do gornjeg kvartila (od 25. do 75. percentila), a središnja linija predstavlja medijan. Horizontalne linije se pružaju od minimalne do maksimalne vrijednosti (vrijednosti koje odstupaju (tzv. „outside“ i „far out“ vrijednosti) prikazane su kao izdvojene točke).

4.2.3.4. Koncentracija moždanog neurotrofnog čimbenika u plazmi i skala procjene Alzheimerove bolesti - kognitivna podskala

Povezanost broja bodova na podskali ADAS-Cog i koncentracije proteina BDNF u plazmi svih uzoraka, bez obzira na dijagnozu, određena je izračunavanjem Spearmanovog koeficijenta korelacije (r_s) jer je raspodjela podataka značajno odstupala od normalne razdiobe. Na isti način određena je i povezanost ovih dvaju varijabli zasebno kod ispitanika s dijagnozom AB-a, ispitanika s dijagnozom ostalih tipova demencija i ispitanika kojima je postavljena dijagnoza MCI-a. Rezultati pokazuju da nema značajne korelacije između broja bodova na podskali ADAS-Cog u odnosu na koncentraciju BDNF-a u plazmi kod svih ispitanika zajedno ($r_s=0,08$; $p=0,312$), a isti trend je vidljiv i kada podijelimo ispitanike prema dijagnozi (Tablica 21).

Tablica 21. Korelacija koncentracije moždanog neurotrofnog čimbenika u plazmi ispitanika oboljelih od demencije ili blagog kognitivnog (spoznajnog) poremećaja i broja bodova na skali procjene Alzheimerove bolesti - kognitivna podskala.

Dijagnoza	r_s	p
MCI	-0,05	0,775
AB	0,06	0,541
Demencije drugog tipa	0,15	0,378

AB, Alzheimerova bolest; MCI, blagi kognitivni (spoznajni) poremećaj.

Ukupan broj bodova na podskali ADAS-Cog kreće se u rasponu od 0 do 70, a veći broj bodova (≥ 18) predstavlja značajnije kognitivno oštećenje. Kako bi dodatno ispitali povezanost kognitivnih simptoma, određenih prema broju bodova na podskali ADAS-Cog, i koncentracije BDNF-a u plazmi, svi ispitanici su podijeljeni na osobe s brojem bodova <18 (manje kognitivno oštećenje) i ispitanike s brojem bodova ≥ 18 (značajnije kognitivno oštećenje). Većina ispitanika (81,1%) s dijagnozom MCI-a nalazi se u skupini osoba s manjim kognitivnim oštećenjem (<18).

Usporedba je napravljena između svih ispitanika zajedno ($U=892,00$; $p=0,790$) i unutar pojedinih skupina ispitanika podijeljenih s obzirom na dijagnozu na ispitanike s AB-om ($p=0,790$), ispitanike s drugim tipovima demencija ($p=0,489$) i ispitanike s MCI-em ($p=0,313$) (Tablica 22).

Tablica 22. Koncentracija moždanog neurotrofnog čimbenika u plazmi ispitanika oboljelih od demencije ili blagog kognitivnog (spoznajnog) poremećaja prema broju bodova na skali procjene Alzheimerove bolesti - kognitivna podskala.

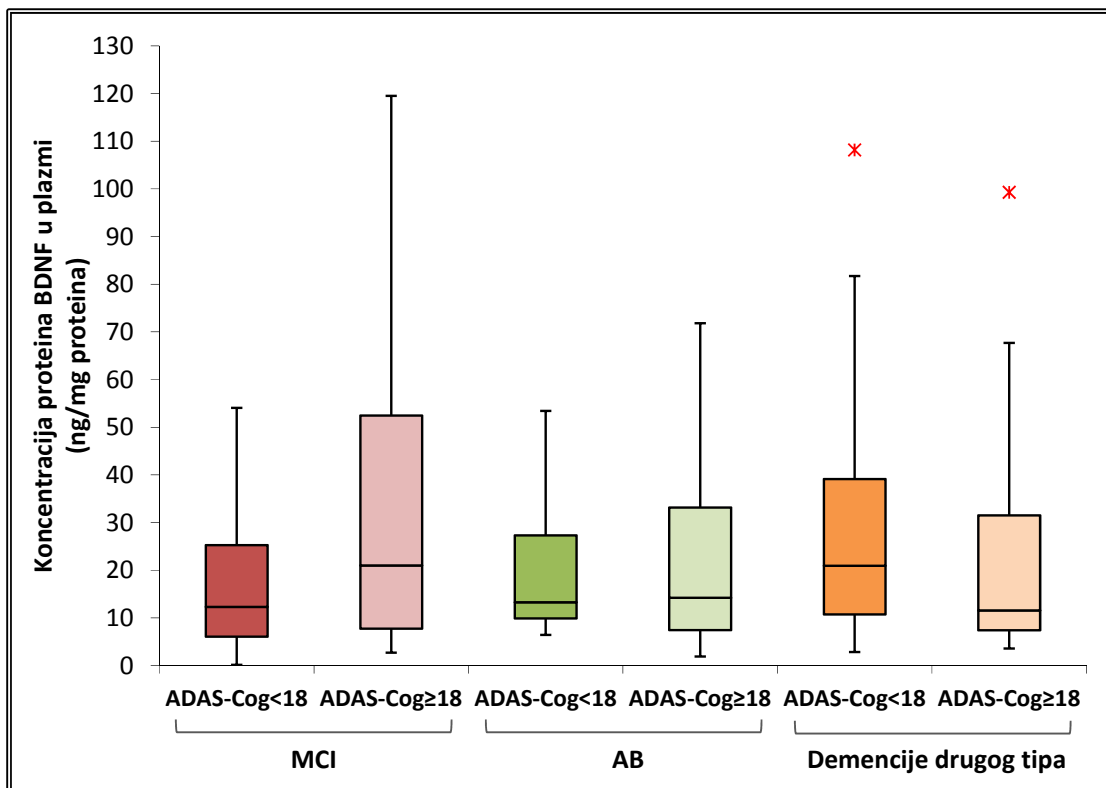
Svi podaci su prikazani kao medijan (25.-75. percentil).

Dijagnoza	ADAS-Cog bodovi		Mann-Whitney U test	
	<18	≥18	U	p
MCI	12,3 (6,1 – 25,3)	21,0 (7,7 – 52,5)	79,00	0,313
AB	13,3 (9,9 – 27,3)	14,2 (7,4 – 33,2)	892,00	0,790
Demencije drugog tipa	20,9 (10,7 – 39,1)	11,5 (7,4– 31,5)	128,00	0,489

AB, Alzheimerova bolest; ADAS-Cog, skala procjene Alzheimerove bolesti - kognitivna podskala; MCI, blagi kognitivni (spoznajni) poremećaj.

Rezultati pokazuju da nema povezanosti koncentracije BDNF-a u plazmi s razinom kognitivnog oštećenja procijenjenog pomoću podskale ADAS-Cog unutar svih dijagnostičkih kategorija.

Dodatna usporedba skupina ispitanika s AB-om, s MCI-em ili dijagnozom ostalih tipova demencija, koje su podijeljene na kategorije prema broju ADAS-Cog bodova, ukazuje da nema značajne razlike u vrijednostima koncentracije proteina BDNF kada se sve skupine međusobno usporede ($H=2,78$; $df=5$; $p=0,734$) (Slika 28).



Slika 28. Grafički prikaz koncentracije moždanog neurotrofnog čimbenika (BDNF) u plazmi ispitanika s dijagnozom blagog kognitivnog (spoznajnog) poremećaja (MCI), ispitanika s dijagnozom Alzheimerove bolesti (AB) i ispitanika s demencijama drugog tipa koji su svi dodatno podijeljeni prema broju bodova na skali procjene Alzheimerove bolesti - kognitivna podskala (ADAS-Cog) na osobe s brojem bodova <18 (manje kognitivno oštećenje) i ispitanike s brojem bodova ≥18 (značajnije kognitivno oštećenje). Središnji pravokutnik predstavlja vrijednosti od donjeg do gornjeg kvartila (od 25. do 75. percentila), a središnja linija predstavlja medijan. Horizontalne linije se pružaju od minimalne do maksimalne vrijednosti (vrijednosti koje odstupaju (tzv. „outside“ i „far out“ vrijednosti) prikazane su kao izdvojene točke).

4.2.3.5. Koncentracija moždanog neurotrofnog čimbenika u plazmi i klinička skala za rangiranje demencije

Skala CDR koristi se za definiranje stupnja ozbiljnosti demencije na način da ukupni rang CDR-0 označava da nema nikakvog kognitivnog oštećenja, a daljnje točke označavaju različite stupnjeve demencije:

- CDR-0,5 = vrlo blagi oblik demencije,
- CDR-1 = blagi oblik demencije,
- CDR-2 = umjereni oblik demencije,
- CDR-3 = teški oblik demencije.

Povezanost ukupnog ranga na skali CDR i koncentracije proteina BDNF u plazmi svih uzoraka, bez obzira na dijagnozu, određena je uspoređivanjem koncentracije BDNF-a u plazmi ispitanika podijeljenih prema CDR rangu. Rezultati Kruskal-Wallisovog testa pokazuju da nema značajne razlike u koncentraciji proteina BDNF u plazmi svih ispitanika podijeljenih prema CDR rangu ($H=1,05$; $df=4$; $p=0,902$). Na isti način određena je i povezanost ovih dvaju varijabli zasebno kod ispitanika s dijagnozom AB-a, ispitanika s dijagnozom ostalih tipova demencija i ispitanika kojima je postavljena dijagnoza MCI-a. Rezultati pokazuju da nema značajne razlike u koncentraciji BDNF-a u plazmi s obzirom na CDR rang niti nakon podjele ispitanika prema dijagnozi (Tablica 23).

Tablica 23. Koncentracija moždanog neurotrofnog čimbenika u plazmi ispitanika oboljelih blagog kognitivnog (spoznajnog) poremećaja ili demencije prema rangu kliničke skale za rangiranje demencija. Svi podaci su prikazani kao medijan (25.-75. percentil).

Dijagnoza	CDR rang					Kruskal-Wallisov test	
	0	0,5	1	2	3	H	p
MCI	18,8 (13,6 – 23,6)	12,2 (6,5 – 23,5)	15,6 (7,8 – 37,8)	-	-	1,20 (df=2)	0,549
AB	-	14,5 (9,5 – 37,7)	17,0 (9,4 – 27,5)	18,2 (11,6 – 65,5)	38,8 (38,8 – 38,8)	1,28 (df=3)	0,733
Demencije drugog tipa	-	21,1 (12,2 – 67,8)	8,9 (7,3 – 16,2)	9,4 (6,6 – 13,4)	7,9 (5,7 – 10,2)	5,60 (df=3)	0,133

AB, Alzheimerova bolest; CDR, klinička skala za rangiranje demencija; MCI, blagi kognitivni (spoznajni) poremećaj.

Zbog malog broja ispitanika u pojedini skupinama koje su definirane prema CDR rangu, ispitanici s dijagnozom demencije kombinirani su i podijeljeni na iduće podskupine:

- CDR-0,5 i CDR-1 = vrlo blagi do blagi oblik demencije,
- CDR-2 i CDR-3= umjereni i teški oblik demencije.

Ispitanici s dijagnozom MCI-a nalaze se svi unutar skupine ispitanika s CDR rangom od 0,5 do 1. Rezultati usporedbe koncentracije BDNF-a u plazmi ispitanika podijeljenih u dvije gore navedene kategorije prikazani su u Tablici 24. Rezultati pokazuju da unutar skupina s dijagnozom AB-a ($p=0,438$) ili s dijagnozom drugih tipova demencija ($p=0,112$) nema razlike u koncentraciji BDNF-a u plazmi, ali je vidljiv trend koji je sličan do sada dobivenim rezultatima, a koji upućuje na povezanost težih oblika demencije sa smanjenom koncentracijom proteina BDNF u plazmi u odnosu na blaži oblik demencije. U slučaju AB-a trend je opet obrnut, ali rezultati nisu statistički značajni.

Tablica 24. Koncentracija moždanog neurotrofnog čimbenika u plazmi ispitanika oboljelih od demencije prema rangu kliničke skale za rangiranje demencija.

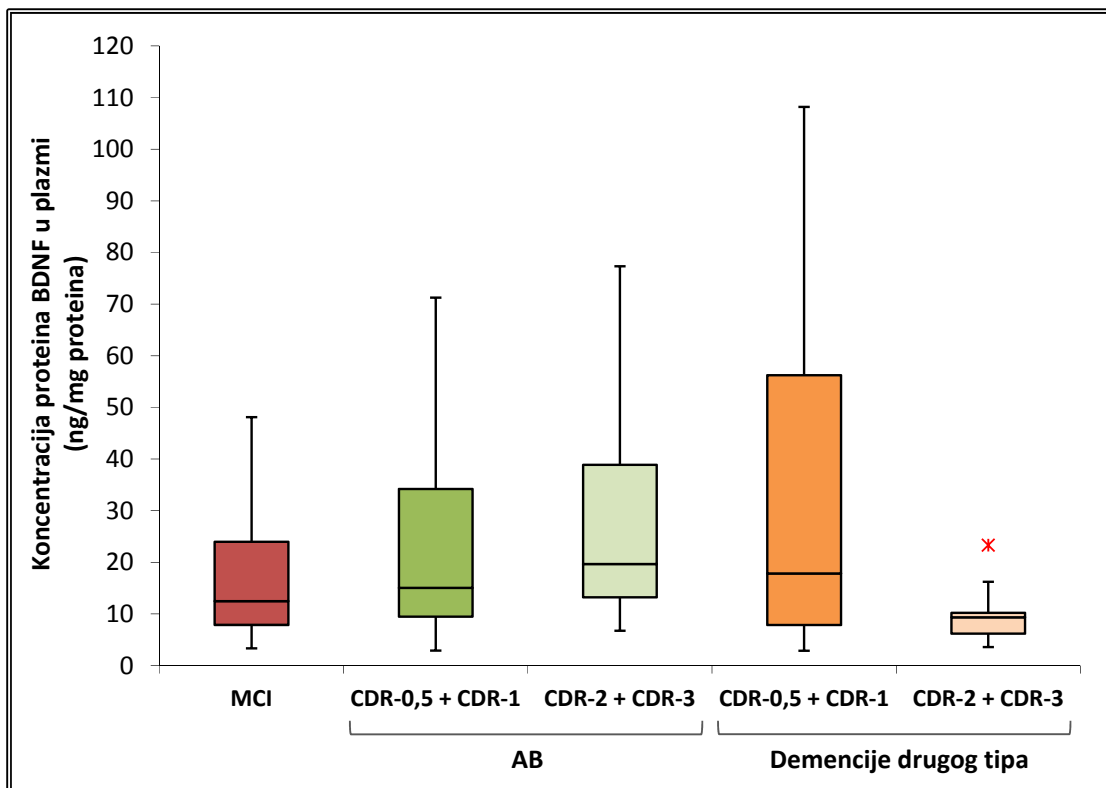
Svi podaci su prikazani kao medijan (25.-75. percentil).

Dijagnoza	CDR rang		Mann-Whitney U test	
	CDR-0,5 + CDR-1	CDR-2 + CDR-3	U	p
AB	15,0 (9,5 – 34,2)	19,6 (13,2 – 38,8)	155,00	0,438
Demencije drugog tipa	17,8 (7,8 – 56,2)	9,4 (6,2 – 10,2)	39,00	0,112

AB, Alzheimerova bolest; CDR, klinička skala za rangiranje demencija.

Rezultati pokazuju da nema povezanosti koncentracije BDNF-a u plazmi s razinom kognitivnog oštećenja procijenjenog pomoću skale CDR unutar svih dijagnostičkih kategorija.

Dodatna usporedba skupina ispitanika s AB-om, s MCI-em ili dijagnozom ostalih tipova demencija, koje su podijeljene na kategorije prema CDR-rangu na gore navedene dvije podskupine, ukazuje da nema statistički značajne razlike u vrijednostima koncentracije proteina BDNF kada se sve skupine međusobno usporede ($H = 5,48$; $df=4$; $p=0,242$) (Slika 29).



Slika 29. Grafički prikaz koncentracije moždanog neurotrofnog čimbenika (BDNF) u plazmi ispitanika s dijagnozom blagog kognitivnog (spoznajnog) poremećaja (MCI), ispitanika s dijagnozom Alzheimerove bolesti (AB) i ispitanika s demencijama drugog tipa koji su svi dodatno podijeljeni prema rangu kliničke skale za rangiranje demencija (CDR) na podskupine: CDR-0,5 + CDR-1 (vrlo blagi do blagi oblik demencije) i CDR-2 + CDR-3 (umjereni i teški oblik demencije).

Središnji pravokutnik predstavlja vrijednosti od donjeg do gornjeg kvartila (od 25. do 75. percentila), a središnja linija predstavlja medijan. Horizontalne linije se pružaju od minimalne do maksimalne vrijednosti (vrijednosti koje odstupaju (tzv. „outside“ i „far out“ vrijednosti) prikazane su kao izdvojene točke).

4.2.4. Koncentracija moždanog neurotrofnog čimbenika u plazmi te bihevioralni i psihološki simptomi demencije

Kako bi se provjerilo da li postoji povezanost BPSD-a s koncentracijom proteina BDNF u plazmi ispitanika s dijagnozom demencije analizirana je korelacija koncentracije BDNF-a u plazmi s ukupnim brojem bodova na skali NPI i na pojedinim domenama ove skale (NPI-A do NPI-L) te korelacija s brojem bodova na skali BEHAVE-AD.

Kako bi se provjerilo postoji li utjecaj dobi, spola ispitanika te duljine trajanja obrazovanja na BPSD provedena je višestruka regresijska analiza s ukupnim brojem bodova na skali NPI ili BEHAVE-AD kao zavisnom varijablom te dobi, spolom i obrazovanjem kao nezavisnim varijablama. Analiza je pokazala da analizirane varijable nemaju značajan utjecaj na ukupni zbroj bodova na NPI-u (korigirani $R^2=0,009$; $F=0,46$; $p=0,713$) i skali BEHAVE-AD (korigirani $R^2=0,034$; $F=1,80$; $p=0,177$).

4.2.4.1. Koncentracija moždanog neurotrofnog čimbenika u plazmi i skala neuropsihijatrijski inventar

Povezanost broja bodova na NPI-u i koncentracije proteina BDNF u plazmi osoba s dijagnozom demencije određena je izračunavanjem Spearmanovog koeficijenta korelacije (r_s) jer je raspodjela podataka značajno odstupala od normalne razdiobe (Tablica 25).

Kod svih ispitanika testirana je korelacija i 12 domena koje NPI prati (Tablica 25):

- deluzije/sumanutosti (NPI-A),
- halucinacije (NPI-B),
- agitacija/agresija (NPI-C),
- depresija/disforija (NPI-D),
- anksioznost (NPI-E),
- ushićenje/euforija (NPI-F),
- apatija/ravnodušnost (NPI-G),
- dezinhibicija (NPI-H),
- razdražljivost/labilnost (NPI-I),
- aberantno motoričko ponašanje (NPI-J),
- poremećaji spavanja i noćni nemir (NPI-K),
- poremećaji prehrane i apetita (NPI-L).

Rezultati pokazuju da postoji pozitivna i statistički značajna korelacija između koncentracije proteina BDNF u plazmi i broja bodova za domene NPI-E: anksioznost ($p=0,002$), NPI-K: poremećaji spavanja i noćni nemir ($p=0,025$) te NPI-L: poremećaji prehrane i apetita ($p=0,039$) (Tablica 25).

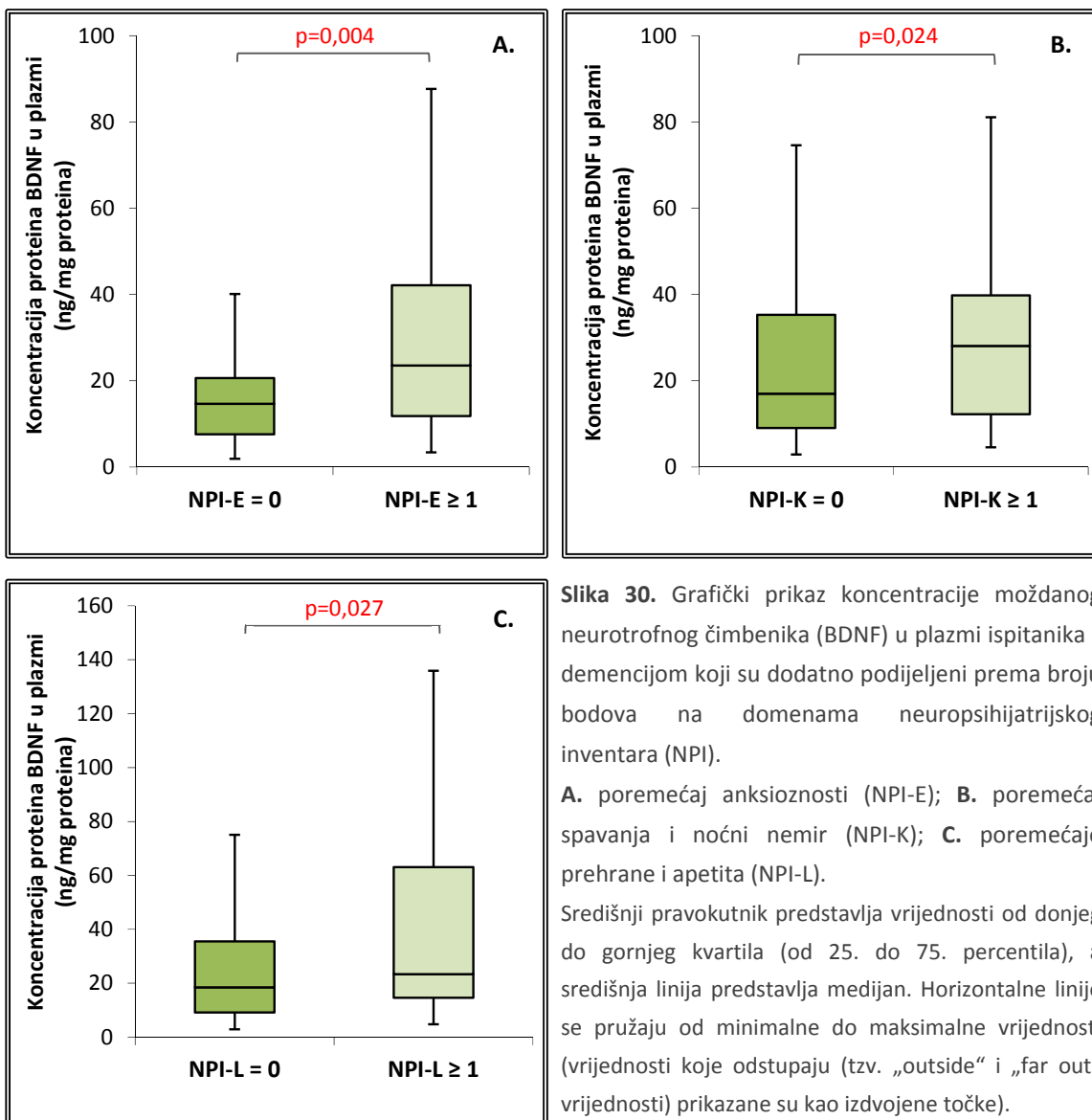
Tablica 25. Korelacija koncentracije moždanog neurotrofnog čimbenika u plazmi ispitanika oboljelih od demencije i broja bodova na neuropsihijatrijskom inventaru.

NPI	Korelacija	
	r_s	p
NPI-ukupno	0,07	0,300
NPI-A: deluzije	0,01	0,954
NPI-B: halucinacije	-0,06	0,489
NPI-C: agitacija/agresija	-0,10	0,276
NPI-D: depresija/disforija	0,08	0,236
NPI-E: anksioznost	0,22	0,002
NPI-F: ushićenje/euforija	-0,01	0,917
NPI-G: apatija/ravnodušnost	-0,10	0,165
NPI-H: dezinhibicija	0,07	0,312
NPI-I: razdražljivost/labilnost	-0,04	0,590
NPI-J: aberantno motoričko ponašanje	-0,10	0,167
NPI-K: poremećaji spavanja i noćni nemir	0,19	0,025
NPI-L: poremećaji prehrane i apetita	0,18	0,039

NPI, neuropsihijatrijski inventar.

Kako bi dodatno ispitali povezanost pojedinih psihijatrijskih simptoma i koncentracije BDNF-a u plazmi, svi ispitanici su podijeljeni prema broju bodova na pojedinim NPI domenama koje koreliraju s koncentracijom BDNF-a (Tablica 25) na osobe s 0 (bez simptoma/poremećaja) i ispitanike s brojem bodova ≥ 1 (sa simptomima/poremećajem).

Rezultati Mann-Whitney U testa dodatno su potvrdili značajnu povezanost koncentracije BDNF-a u plazmi sa simptomima anksioznosti ($U=1641,00$; $p=0,004$) (Slika 30A), poremećajima spavanja i noćnim nemirom ($U=869,00$; $p=0,024$) (Slika 30B) te poremećajima prehrane i apetita ($U=623,00$; $p=0,020$) (Slika 30C) kod ispitanika kojima je dijagnosticiran AB.



Slika 30. Grafički prikaz koncentracije moždanog neurotrofnog čimbenika (BDNF) u plazmi ispitanika s demencijom koji su dodatno podijeljeni prema broju bodova na domenama neuropsihijatrijskog inventara (NPI).

A. poremećaj anksioznosti (NPI-E); **B.** poremećaj spavanja i noćni nemir (NPI-K); **C.** poremećaje prehrane i apetita (NPI-L).

Središnji pravokutnik predstavlja vrijednosti od donjeg do gornjeg kvartila (od 25. do 75. percentila), a središnja linija predstavlja medijan. Horizontalne linije se pružaju od minimalne do maksimalne vrijednosti (vrijednosti koje odstupaju (tzv. „outside“ i „far out“ vrijednosti) prikazane su kao izdvojene točke).

4.2.4.2. Koncentracija moždanog neurotrofnog čimbenika u plazmi i skala za procjenu bihevioralne patologije u Alzheimerovoj bolesti

Kod ispitanika s dijagnozom AB-a napravljena je analiza povezanosti ukupnog broja bodova na skali BEHAVE-AD s koncentracijom proteina BDNF u plazmi. Rezultati pokazuju da ove dvije varijable nisu u značajnoj korelaciji ($r_s = -0,20$; $p = 0,192$).

4.3. Polimorfizmi gena za moždani neurotrofni čimbenik i tropomiozin-receptor-kinazu B

Genotipizacija metodom PCR-a u stvarnom vremenu dala je podatke o učestalosti genotipova i alela s obzirom na ukupno 5 istraživanih polimorfizama gena BDNF i jednog polimorfizma u genu za TrkB. Tablica 26 navodi oznake, pozicije, alele, udio rjeđeg alela u populaciji ispitanika uključenih u istraživanje te p vrijednosti koje se odnose na analizu odstupanja raspodjele genotipova od Hardy-Weinbergove ravnoteže (HWE).

Tablica 26. Polimorfizmi gena za moždani neurotrofni čimbenik i tropomiozin-receptor-kinazu B.

SNP	Starija oznaka	Gen/kromosom/pozicija	Lokacija	Alel 1	Alel 2	Udio rjeđeg alela	HWE p vrijednost
rs1519480	-	BDNF/11/27675712	3' regija (flanking)	G	A	0,261	0,373
rs6265	Val66Met	BDNF/11/27679916	ekson	G	A	0,186	0,624
rs11030104	-	BDNF/11/27684517	intron	T	C	0,230	0,181
rs56164415	C270T	BDNF/11/27721735	intron	C	T	0,075	0,514
rs7934165	-	BDNF/11/27731983	intron	A	G	0,498	0,594
rs1439050	-	TrkB/9/84673278	intron	G	T	0,346	0,085

BDNF, moždani neurotrofni čimbenik; HWE, Hardy-Weinberg ravnoteža; Met, metionin; TrkB, tropomiozin-receptor-kinaza B; Val, valin; SNP, polimorfizam jedne baze.

4.3.1. Polimorfizmi gena za moždani neurotrofni čimbenik i tropomiozin-receptor-kinazu B kod oboljelih od demencije ili blagog kognitivnog (spoznajnog) poremećaja

Pomoću χ^2 -testa provjereno je postoji li značajna razlika u frekvenciji genotipova između muških i ženskih ispitanika unutar dijagnostičkih skupina (Tablica 27). Jedino je u skupini ispitanika s dijagnozom AB-a u slučaju polimorfizma rs56164415 pronađena značajna razlika u distribuciji genotipova između muških i ženskih ispitanika (Tablica 27). Zbog tog nalaza, u analizama vezanim za polimorfizam rs56164415 dodatno je provjeren i mogući utjecaj spola, dok su u slučaju ostalih polimorfizama daljnje analize napravljene bez podjele po spolu.

Kada je udio recesivnih homozigota istraživanih polimorfizama gena BDNF i TrkB bio premali (<6%) nosioci rjeđeg alela kombinirani su u zajedničku skupinu kako bi se izbjegla moguća pogreška pri analizi podataka zbog premale frekvencije pojedinih genotipova unutar istraživanih skupina. Na ovaj način su kombinirani nosioci rjeđeg alela kod polimorfizama: rs1519480 (f(GG)=5,7%), rs6265 (f(AA)=2,8%), rs11030104 (f(CC)=3,8%) i rs56164415 (f(TT)=0,9%).

Tablica 27. Utjecaj spola na distribuciju genotipova s obzirom na polimorfizme gena za moždani neurotrofni čimbenik i tropomiozin-receptor-kinazu B u skupini ispitanika s dijagnozom blagog kognitivnog (spoznajnog) poremećaja, ispitanika s dijagnozom Alzheimerove bolesti i ispitanika s demencijama drugog tipa.

SNP	MCI			AB			Demencije drugog tipa		
	χ^2	df	p	χ^2	df	p	χ^2	df	p
rs1519480	0,54	1	0,462	0,21	1	0,645	0,85	1	0,355
rs6265	1,64	1	0,201	2,35	1	0,125	2,76	1	0,097
rs11030104	0,04	1	0,848	2,00	1	0,157	0,73	1	0,394
rs56164415	0,04	1	0,832	6,38	1	0,012	2,15	1	0,143
rs7934165	2,03	2	0,362	2,15	2	0,342	2,38	2	0,304
rs1439050	0,55	2	0,759	0,15	2	0,929	2,11	2	0,349

AB, Alzheimerova bolest; MCI, blagi kognitivni (spoznajni) poremećaj; SNP, polimorfizam jedne baze.

Distribucije genotipova i alela s obzirom na sve istraživane polimorfizme gena BDNF i TrkB kod skupine ispitanika s dijagnozom AB-a, skupine ispitanika s dijagnozom demencija drugog tipa te skupine kojoj je dijagnosticiran MCI prikazane su u Tablici 28. Rezultati pokazuju da nema značajne razlike u raspodjeli genotipova i alela između uspoređivanih skupina ispitanika (Tablica 28).

Tablica 28. Distribucija alela i genotipova s obzirom na polimorfizme gena za moždani neurotrofni čimbenik i tropomiozin-receptor-kinazu B kod ispitanika s dijagnozom blagog kognitivnog (spoznajnog) poremećaja, ispitanika s dijagnozom Alzheimerove bolesti i ispitanika s dijagnozom ostalih tipova demencija.

Gen	SNP	MCI			AB			Demencije drugog tipa				
		N (%)			N (%)			N (%)				
BDNF	rs1519480	Genotip										
		AA	33 (55,9)		116 (56,0)		21 (40,4)					
		Nosioci alela G	26 (44,1)		91 (44,0)		31 (59,6)					
		X²-test	X²=3,23; df=2; p=0,118									
		Aleli										
		A	89 (75,4)		312 (75,4)		69 (66,3)					
		G	29 (24,6)		102 (24,6)		35 (33,7)					
		X²-test	X²=3,68; df=2; p=0,159									
		BDNF	rs6265 (Val66Met)	Genotip								
				GG	43 (72,9)		130 (62,8)		36 (69,2)			
Nosioci alela A	16 (27,1)				77 (37,2)		16 (30,8)					
X²-test	X²=2,41; df=2; p=0,300											
Aleli												
G	101 (85,6)				330 (79,7)		87 (83,7)					
A	17 (14,4)				84 (20,3)		17 (16,3)					
X²-test	X²=2,50; df=2; p=0,286											
BDNF	rs11030104			Genotip								
				TT	39 (66,1)		112 (54,1)		33 (63,5)			
		Nosioci alela C	20 (33,9)		95 (45,9)		19 (36,5)					
		X²-test	X²=3,51; df=2; p=0,173									
		Aleli										
		T	97 (82,2)		310 (74,9)		83 (79,8)					
		C	21 (17,8)		104 (25,1)		21 (20,2)					
		X²-test	X²=2,50; df=2; p=0,190									
		BDNF	rs56164415	Genotip								
				C	53 (89,8)		176 (85,0)		44 (84,6)			
Nosioci alela T	6 (10,2)				31 (15,0)		8 (15,4)					
X²-test	X²=0,95; df=2; p=0,622											
Aleli												
C	111 (94,1)				383 (92,5)		94 (90,4)					
T	7 (5,9)				31 (7,5)		10 (9,6)					
X²-test	X²=1,08; df=2; p=0,582											

AB, Alzheimerova bolest; BDNF, moždani neurotrofni čimbenik; MCI, blagi kognitivni (spoznajni) poremećaj; N, broj ispitanika; SNP, polimorfizam jedne baze; TrkB, tropomiozin-receptor-kinaza B.

Tablica 28. ...nastavak

Gen	SNP	MCI			AB			Demencije drugog tipa		
		N (%)			N (%)			N (%)		
BDNF	rs7934165	Genotip								
		AA	17 (28,8)	49 (23,7)	10 (23,3)					
		AG	34 (57,6)	107 (51,7)	24 (55,8)					
		GG	8 (13,6)	51 (24,6)	18 (41,9)					
		X²-test	X²=6,88; df=4; p=0,142							
		Aleli								
		A	68 (57,6)	109 (34,3)	44 (42,3)					
G	50 (42,4)	209 (65,7)	60 (57,7)							
X²-test	X²=5,24; df=2; p=0,073									
TrkB	rs1439050	Genotip								
		GG	26 (44,1)	92 (44,5)	25 (48,1)					
		GT	22 (37,3)	87 (42,0)	21 (40,4)					
		TT	11 (18,6)	28 (13,5)	6 (11,5)					
		X²-test	X²=1,54; df=4; p=0,819							
		Aleli								
		G	63 (58,9)	271 (65,5)	71 (68,3)					
T	44 (41,1)	143 (34,5)	33 (31,7)							
X²-test	X²=0,76; df=2; p=0,685									

AB, Alzheimerova bolest; BDNF, moždani neurotrofni čimbenik; MCI, blagi kognitivni (spoznajni) poremećaj; N, broj ispitanika; SNP, polimorfizam jedne baze; TrkB, tropomiozin-receptor-kinaza B.

U slučaju polimorfizma rs56164415 usporedba raspodjele genotipova između uspoređivanih skupina, koje su još dodatno podijeljene po spolu, potvrđuje nedostatak značajne razlike u distribuciji genotipova kod muških ispitanika ($\chi^2=3,66$; $df=2$; $p=0,160$) i ženskih ispitanica ($\chi^2=0,99$; $df=2$; $p=0,610$).

4.3.2. Polimorfizmi gena za moždani neurotrofni čimbenik i tropomiozin-receptor-kinazu B u kognitivnim simptomima demencije

Normalna razdiobe podataka vezanih za broj bodova na pojedinim psihometrijskim testovima kojima su procjenjivani kognitivni simptomi demencije za sve skupine ispitanika testirana je Kolmogorov-Smirnovim testom. S obzirom na odstupanja od normalne razdiobe podataka, u svim analizama korišteni su neparametrijski testovi za statističku obradu podataka.

4.3.2.1. Polimorfizmi gena za moždani neurotrofni čimbenik te tropomiozin-receptor-kinazu B i test procjene mentalnog stanja

Povezanost broja bodova na testu MMSE i polimorfizama gena BDNF i TrkB određena je za svaki istraživani polimorfizam zasebno kod ispitanika s dijagnozom AB-a, ispitanika s dijagnozom ostalih tipova demencije i ispitanika kojima je postavljena dijagnoza MCI-a. Rezultati pokazuju da nema značajnog utjecaja genotipova, s obzirom na sve analizirane polimorfizme gena BDNF i polimorfizam rs1439050 gena TrkB, na ukupan broj bodova na testu MMSE u sve tri skupine ispitanika (Tablica 29).

Tablica 29. Utjecaj genotipova s obzirom na polimorfizme gena za moždani neurotrofni čimbenik i tropomiozin-receptor-kinazu B na broj bodova na testu procjene mentalnog stanja kod ispitanika s dijagnozom blagog kognitivnog (spoznajnog) poremećaja, ispitanika s dijagnozom Alzheimerove bolesti i ispitanika s dijagnozom ostalih tipova demencija.

Svi podaci su prikazani kao medijan (25.-75. percentil).

Gen	SNP	Genotip	MCI	AB	Demencije drugog tipa
BDNF	rs1519480	AA	26,0 (24,0-27,0)	18,0 (13,8-21,2)	19,5 (13,5-24,0)
		Nosioci alela G	25,0 (24,0-26,0)	20 (15,8-22,0)	19,0 (17,0-25,0)
		Mann-Whitney U test	U=233,00; p=0,387	U=2531,50; p=0,124	U=206,00; p=0,959
BDNF	rs6265 (Val66Met)	GG	26,0 (24,5-26,5)	19,0 (14,0-22,0)	19,5 (16,0-25,0)
		Nosioci alela A	26,0 (23,2-27,0)	18,0 (14,5-21,0)	18,5 (15,0-24,0)
		Mann-Whitney U test	U=235,50; p=0,917	U=2493,00; p=0,543	U=165,00; p=0,676
BDNF	rs11030104	TT	25,5 (24,0-26,0)	18,5 (14,0-23,0)	19,0 (16,2-25,0)
		Nosioci alela C	26,0 (24,2-27,0)	18,0 (14,5-21,0)	19,0 (14,5-23,2)
		Mann-Whitney U test	U=236,50; p=0,518	U=2714,00; p=0,542	U=180,50; p=0,563
BDNF	rs56164415	C	26,0 (24,0-27,0)	18,0 (14,0-22,0)	19,0 (15,5-24,0)
		Nosioci alela T	25,0 (23,5-26,0)	19,5 (16,0-22,0)	19,5 (17,0-26,0)
		Mann-Whitney U test	U=73,50; p=0,272	U=1505,00; p=0,443	U=95,00; p=0,640

AB, Alzheimerova bolest; BDNF, moždani neurotrofni čimbenik; MCI, blagi kognitivni (spoznajni) poremećaj; SNP, polimorfizam jedne baze; TrkB, tropomiozin-receptor-kinaza B.

Tablica 29. ...nastavak

Gen	SNP	Genotip	MCI	AB	Demencije drugog tipa
BDNF	rs7934165	AA	25,5 (24,0-26,5)	18,0 (13,0-22,0)	21,0 (13,5-26,5)
		AG	26,0 (24,5-26,5)	18,0 (15,0-22,0)	19,0 (15,8-24,2)
		GG	26,0 (24,2-27,0)	20,0 (16,0-22,0)	19,0 (16,2-21,8)
		Kruskal-Wallis test (df=2)	H=0,18; p=0,914	H=1,34; p=0,512	H=0,54; p=0,764
TrkB	rs1439050	GG	26,0 (24,0-26,0)	20,0 (15,0-23,0)	20,0 (17,8-25,2)
		GT	26,0 (24,0-27,0)	18,0 (13,5-21,0)	17,0 (11,8-20,0)
		TT	26,0 (25,0-28,0)	17,0 (12,8-20,5)	19,0 (17,0-25,0)
		Kruskal-Wallis test (df=2)	H=2,19; p=0,334	H=3,09; p=0,213	H=2,70; p=0,259

AB, Alzheimerova bolest; BDNF, moždani neurotrofni čimbenik; MCI, blagi kognitivni (spoznajni) poremećaj; SNP, polimorfizam jedne baze; TrkB, tropomiozin-receptor-kinaza B.

U slučaju polimorfizma rs56164415 provjereno je postoji li povezanost navedenog polimorfizma s brojem bodova na testu MMSE uzimajući u obzir i spol ispitanika. Rezultat višestruke linearne regresije (korigirani $R^2=0,10$; $F=7,12$; $p<0,001$) pokazuje da polimorfizam rs56164415 (nezavisna varijabla) ne utječe značajno (koeficijent=0,965; $t=0,88$; $p=0,380$) na broj bodova na MMSE-u (zavisna varijabla) niti nakon korekcije za spol, dijagnozu i dob.

Kako bi dodatno ispitali povezanost kognitivnih simptoma, određenih prema broju bodova na testu MMSE, i koncentracije BDNF-a u plazmi, svi ispitanici su prema broju bodova na MMSE-u podijeljeni u 4 skupine:

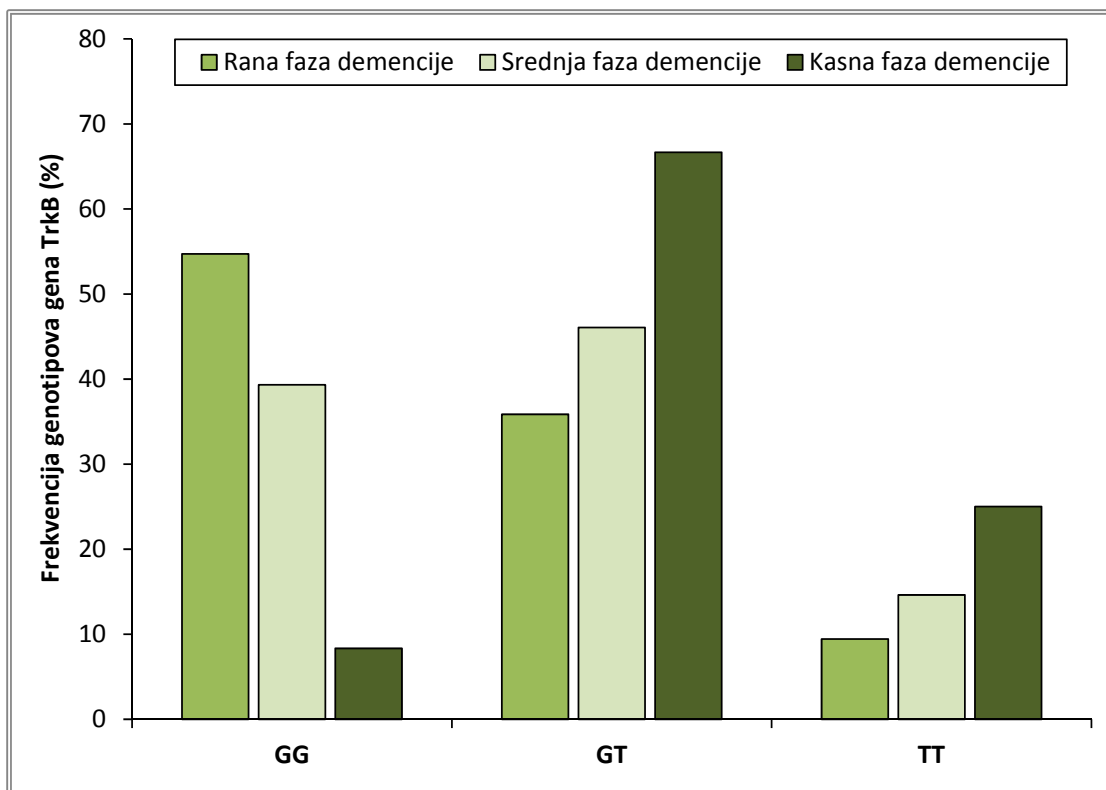
- osobe s normalnim kognitivnim sposobnostima (broj bodova od 27 do 30),
- osobe s blagom demencijom (broj bodova od 21 do 26) – rana faza demencije;
- osobe s umjerenom demencijom (broj bodova od 10 do 20) – srednja faza demencije;
- osobe s teškim oblikom demencije (broj bodova < 10) – kasna faza demencije.

Ispitanici s dijagnozom MCI-a nalaze se u skupini osoba s normalnim kognitivnim sposobnostima i u skupini osoba s blagom demencijom.

Usporedba svih ispitanika zajedno, bez obzira na dijagnozu, podijeljenih u kategorije prema broju bodova na testu MMSE, pokazuje da nema povezanosti između stupnja kognitivnog oštećenja prema MMSE-u i polimorfizama gena BDNF: rs1519480 ($\chi^2=2,39$; $df=3$; $p=0,495$), rs6265 ($\chi^2=2,79$; $df=3$; $p=0,425$), rs11030104 ($\chi^2=3,18$; $df=3$; $p=0,365$), rs56164415 ($\chi^2=3,76$; $df=3$; $p=0,289$), rs7934165 ($\chi^2=0,86$; $df=6$; $p=0,990$). U slučaju polimorfizma rs56164415 razlika nije vidljiva niti nakon podjele na muške ispitanike ($\chi^2=4,08$; $df=3$; $p=0,253$) i ženske ispitanice ($\chi^2=1,12$; $df=3$; $p=0,774$). Rezultati

pokazuju značajnu razliku u raspodijeli genotipova s obzirom na polimorfizam rs1439050, koji se nalazi u genu TrkB, između ispitanika podijeljenih u kategorije prema broju bodova na testu MMSE ($\chi^2=15,32$; $df=6$; $p=0,018$). Spomenuta značajna razlika posljedica je smanjenog udjela genotipa GG među ispitanicima s teškim oblikom demencije u odnosu na ostale skupine ($R=-1,92$).

Kako bi se dodatno ispitaio utjecaj ovog polimorfizma, uspoređene su skupine ispitanika s AB-om (koji su podijeljeni na kategorije prema broju MMSE bodova) i skupine ispitanika s MCI-em ili dijagnozom ostalih tipova demencija (koje nisu podijeljene na kategorije prema broju MMSE bodova). Rezultat pokazuje da se istraživane skupine ne razlikuju značajno u distribuciji genotipova s obzirom na polimorfizam gena TrkB ($\chi^2=12,85$; $df=8$; $p=0,117$). Međutim, razlika je prisutna ako se promatra samo skupina ispitanika s dijagnozom AB-a ($\chi^2=9,57$; $df=4$; $p=0,048$), (Slika 31), radi smanjenog udjela homozigota GG kod osoba u kasnoj fazi bolesti ($R=1,18$).



Slika 31. Distribucija genotipova s obzirom na polimorfizam rs1439050 u genu za tropomiozin-receptor-kinazu B (TrkB) kod ispitanika s dijagnozom Alzheimerove bolesti koji su dodatno podijeljeni, prema broju bodova na testu procjene mentalnog stanja, na bolesnike u ranoj, srednjoj i kasnoj fazi bolesti.

4.3.2.2. Polimorfizmi gena za moždani neurotrofni čimbenik te tropomiozin-receptor-kinazu B i test crtanja sata

Povezanost broja bodova na testu CDT i polimorfizama gena BDNF i TrkB određena je za svaki istraživani polimorfizam zasebno kod ispitanika s dijagnozom AB-a, ispitanika s dijagnozom ostalih tipova demencija i ispitanika kojima je postavljena dijagnoza MCI-a. Rezultati pokazuju da nema značajnog utjecaja genotipova, s obzirom na polimorfizme rs1519480, rs6265, rs56164415 i rs7934165 gena BDNF, na ukupan broj bodova na testu CDT u sve tri skupine ispitanika (Tablica 30).

Tablica 30. Utjecaj genotipova s obzirom na polimorfizme gena za moždani neurotrofni čimbenik i tropomiozin-receptor-kinazu B na broj bodova na testu crtanja sata kod ispitanika s dijagnozom blagog kognitivnog (spoznajnog) poremećaja, ispitanika s dijagnozom Alzheimerove bolesti i ispitanika s dijagnozom ostalih tipova demencija.

Svi podaci su prikazani kao medijan (25.-75. percentil).

Gen	SNP	Genotip	MCI	AB	Demencije drugog tipa
BDNF	rs1519480	AA	10,0 (7,8-10,0)	5,0 (5,0-8,0)	6,0 (4,0-7,5)
		Nosioci alela G	10,0 (6,0-10,0)	6,0 (5,0-7,6)	6,0 (4,5-7,0)
		Mann-Whitney U test	U=273,50; p=0,226	U=1240,50; p=0,293	U=203,00; p=0,979
BDNF	rs6265 (Val66Met)	GG	9,0 (7,0-10,0)	6,0 (5,0-8,0)	6,0 (4,8-7,0)
		Nosioci alela A	10,0 (7,5-10,0)	5,0 (4,0-7,0)	6,0 (4,0-7,0)
		Mann-Whitney U test	U=238,50; p=0,301	U=978,50; p=0,057	U=172,00; p=0,954
BDNF	rs11030104	TT	9,0 (7,0-10,0)	6,0 (5,0-8,0)	6,0 (5,0-7,0)
		Nosioci alela C	10,0 (7,5-10,0)	5,0 (4,0-6,8)	6,0 (4,0-6,8)
		Mann-Whitney U test	U=279,00; p=0,416	U=975,50; p=0,013	U=179,50; p=0,671
BDNF	rs56164415	C	9,0 (7,0-10,0)	6,0 (5,0-8,0)	6,0 (4,0-7,0)
		Nosioci alela T	10,0 (9,0-10,0)	6,0 (5,0-7,4)	6,0 (5,0-6,0)
		Mann-Whitney U test	U=108,50; p=0,373	U=724,50; p=0,394	U=91,00; p=0,601

AB, Alzheimerova bolest; BDNF, moždani neurotrofni čimbenik; MCI, blagi kognitivni (spoznajni) poremećaj; SNP, polimorfizam jedne baze; TrkB, tropomiozin-receptor-kinaza B.

Tablica 30. ...nastavak

Gen	SNP	Genotip	MCI	AB	Demencije drugog tipa
BDNF	rs7934165	AA	10,0 (7,9-10,0)	6,0 (5,0-7,5)	6,0 (4,5-9,5)
		AG	9,0 (6,2-10,0)	6,0 (5,0-8,0)	5,0 (4,0-7,0)
		GG	10,0 (6,5-10,0)	5,0 (4,2-7,0)	6,0 (5,0-6,0)
		Kruskal-Wallisov test (df=2)	H=1,19; p=0,550	H=1,31; p=0,519	H=0,54; p=0,763
TrkB	rs1439050	GG	9,0 (7,0-10,0)	6,0 (5,0-7,4)	6,0 (5,0-7,0)
		GT	9,0 (5,9-10,0)	6,0 (5,0-7,1)	4,0 (4,0-6,0)
		TT	10,0 (9,0-10,0)	6,0 (5,0-8,0)	7,5 (5,0-10,0)
		Kruskal-Wallisov test (df=2)	H=3,80; p=0,150	H=0,36; p=0,834	H=8,15; p=0,017

AB, Alzheimerova bolest; BDNF, moždani neurotrofni čimbenik; MCI, blagi kognitivni (spoznajni) poremećaj; SNP, polimorfizam jedne baze; TrkB, tropomiozin-receptor-kinaza B.

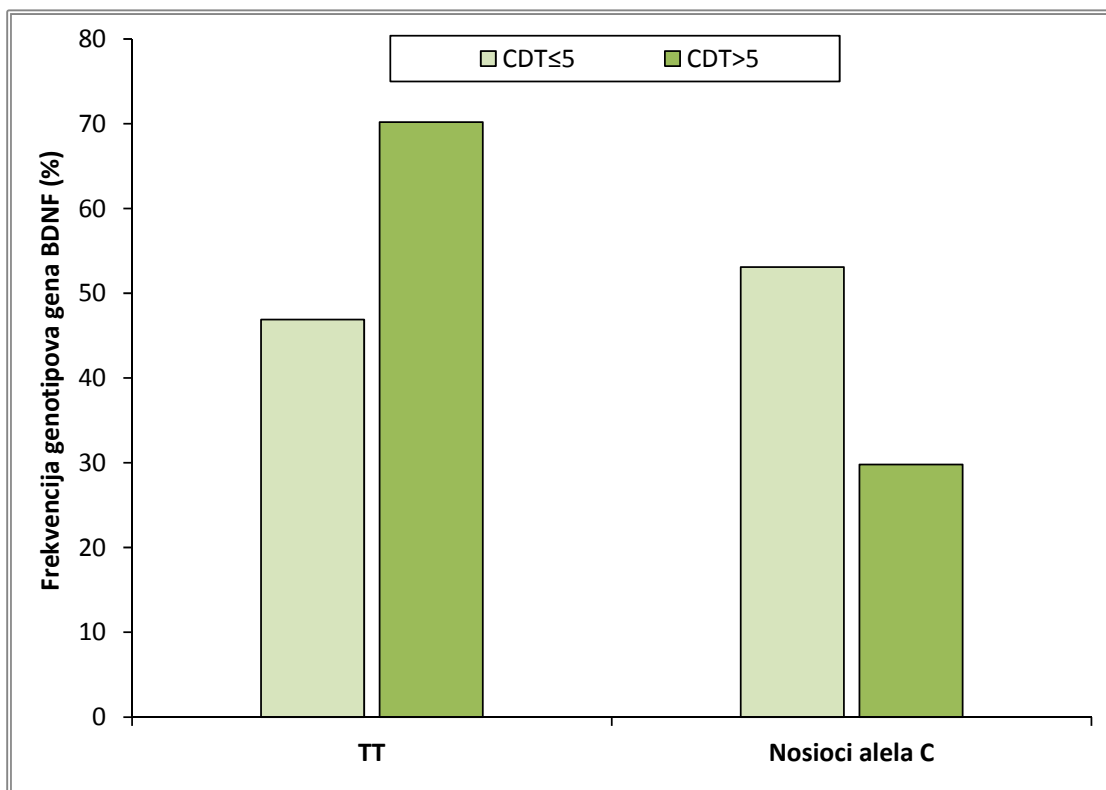
U slučaju polimorfizma rs1103014 gena BDNF rezultat Mann-Whitney U testa pokazuje da osobe s dijagnozom AB-a, koje su nosioci alela C s obzirom na ovaj polimorfizam, imaju niži ukupan broj bodova na CDT-u ($p=0,013$), što upućuje na veće kognitivno oštećenje kod ovih ispitanika. Polimorfizam rs1439050 koji je smješten u intronskoj regiji gena TrkB povezan je s brojem bodova na testu CDT ($p=0,017$) kod ispitanika s dijagnozom ostalih oblika demencije i to tako da osobe koje su heterozigoti s obzirom na ovaj polimorfizam imaju najniži broj ostvarenih bodova na CDT-u tj. izraženije kognitivne simptome u odnosu na druga dva genotipa ($p<0,050$).

Za polimorfizam rs56164415 je provjereno i da li postoji povezanost navedenog polimorfizma s brojem bodova na testu CDT uzimajući u obzir i spol ispitanika. Rezultat višestruke linearne regresije (korigirani $R^2=0,01$; $F=1,57$; $p=0,185$) pokazuje da polimorfizam rs56164415 (nezavisna varijabla) ne utječe značajno (koeficijent=0,574; $t=1,11$; $p=0,268$) na broj bodova na CDT-u (zavisna varijabla) niti nakon korekcije za spol, dijagnozu i dob.

Kako bi dodatno ispitali povezanost kognitivnih simptoma, određenih prema broju bodova na testu CDT, i polimorfizama gena BDNF i TrkB, svi ispitanici su prema metodi koju je predložio Sunderland sa suradnicima (1989) podijeljeni na osobe s brojem bodova ≤ 5 (veće kognitivno oštećenje) i ispitanike s brojem bodova $>0,5$ (slabije kognitivno oštećenje). Većina ispitanika (90,4%) s dijagnozom MCI-a nalazi se u skupini osoba sa slabijim kognitivnim oštećenjem ($>0,5$).

Usporedba svih ispitanika zajedno, bez obzira na dijagnozu, podijeljenih u kategorije prema broju bodova na testu CDT, pokazuje da nema povezanosti između stupnja kognitivnog oštećenja prema CDT-u i polimorfizama gena BDNF i TrkB: rs1519480 ($\chi^2=0,10$; $df=1$; $p=0,758$), rs6265 ($\chi^2=1,88$; $df=1$; $p=0,170$), rs11030104 ($\chi^2=2,54$; $df=1$; $p=0,111$), rs56164415 ($\chi^2=0,08$; $df=1$; $p=0,771$), rs7934165 ($\chi^2=1,80$; $df=2$; $p=0,406$), rs1439050 ($\chi^2=1,90$; $df=2$; $p=0,388$). U slučaju polimorfizma rs56164415 razlika nije vidljiva niti nakon podjele na muške ispitanike ($\chi^2=0,04$; $df=1$; $p=0,852$) i ženske ispitanice ($\chi^2=0,84$; $df=1$; $p=0,359$).

Kako bi se dodatno ispitao utjecaj polimorfizma rs1103014 na broj bodova na testu CDT kod ispitanika s dijagnozom AB-a, napravljena je usporedba skupina ispitanika s AB-om, skupine ispitanika s MCI-em ili dijagnozom ostalih tipova demencija koji su dodatno podijeljene na kategorije prema broju CDT bodova. Rezultat pokazuje da između istraživanih skupina nema značajne razlike u distribuciji genotipova s obzirom na polimorfizam rs1103014 ($\chi^2=6,33$; $df=5$; $p=0,275$), ali postoji značajna razlika ($\chi^2=4,98$; $df=1$; $p=0,026$) ako se promatra samo skupina ispitanika s dijagnozom AB-a (Slika 32). Razlici među istraživanim skupinama najviše pridonosi povećani udio nosioca alela C u skupini s većim kognitivnim oštećenjem ($R=1,37$).



Slika 32. Distribucija genotipova s obzirom na polimorfizam rs11030104 u genu za moždani neurotrofni čimbenik (BDNF) kod ispitanika s dijagnozom Alzheimerove bolesti koji su dodatno podijeljeni, prema broju bodova na testu crtanja sata (CDT) na osobe s brojem bodova ≤ 5 (veće kognitivno oštećenje) i ispitanike s brojem bodova $>0,5$ (slabije kognitivno oštećenje).

Polimorfizam rs1439050 značajno je povezan s brojem bodova na testu CDT kod ispitanika s dijagnozom ostalih tipova demencija pa je njegova uloga dodatno istražena usporedbom skupine ispitanika s AB-om, skupine ispitanika s MCI-em ili dijagnozom ostalih tipova demencija koji su dodatno podijeljene na kategorije prema broju CDT bodova. Rezultat pokazuje da između istraživanih skupina nema značajne razlike u distribuciji genotipova s obzirom na polimorfizam rs1439050 ($\chi^2=7,22$; $df=10$; $p=0,704$) te ta razlika nije prisutna ($\chi^2=3,69$; $df=2$; $p=0,158$) ako se promatra samo skupina ispitanika s dijagnozom drugih tipova demencije.

4.3.2.3. Polimorfizmi gena za moždani neurotrofni čimbenik te tropomiozin-receptor-kinazu B i skala procjene Alzheimerove bolesti - kognitivna podskala

Povezanost broja bodova na testu ADAS-Cog i polimorfizama gena BDNF i TrkB određena je za svaki istraživani polimorfizam zasebno kod ispitanika s dijagnozom AB-a, ispitanika s dijagnozom ostalih tipova demencije i ispitanika kojima je postavljena dijagnoza MCI-a. Rezultati pokazuju da nema značajnog utjecaja genotipova s obzirom na sve polimorfizme gena BDNF i TrkB na ukupan broj bodova na skali ADAS-Cog u sve tri skupine ispitanika (Tablica 31).

Tablica 31. Utjecaj genotipova s obzirom na polimorfizme gena za moždani neurotrofni čimbenik i tropomiozin-receptor-kinazu B na broj bodova na skali procjene Alzheimerove bolesti - kognitivna podskala kod ispitanika s dijagnozom blagog kognitivnog (spoznajnog) poremećaja, ispitanika s dijagnozom Alzheimerove bolesti i ispitanika s dijagnozom ostalih tipova demencija.

Svi podaci su prikazani kao medijan (25.-75. percentil).

Gen	SNP	Genotip	MCI	AB	Demencije drugog tipa
BDNF	rs1519480	AA	8,2 (5,2-17,0)	27,3 (18,3-37,0)	26,1 (6,5-46,5)
		Nosioci alela G	12,4 (7,2-15,7)	29,6 (16,7-40,3)	24,8 (11,4-37,5)
		Mann-Whitney U test	U=141,50; p=0,467	U=1192,50; p=0,825	U=143,00; p=0,973
BDNF	rs6265 (Val66Met)	GG	11,0 (6,4-15,6)	26,9 (18,3-38,3)	25,6 (9,6-39,7)
		Nosioci alela A	7,3 (5,9-21,5)	29,1 (16,8-42,0)	24,1 (13,7-39,2)
		Mann-Whitney U test	U=145,00; p=0,871	U=1177,50; p=0,935	U=95,50; p=0,811

AB, Alzheimerova bolest; BDNF, moždani neurotrofni čimbenik; MCI, blagi kognitivni (spoznajni) poremećaj; SNP, polimorfizam jedne baze; TrkB, tropomiozin-receptor-kinaza B.

Tablica 31. ...nastavak

Gen	SNP	Genotip	MCI	AB	Demencije drugog tipa
BDNF	rs11030104	TT	10,2 (6,0-15,1)	26,9 (18,3-38,3)	25,6 (9,6-39,7)
		Nosioci alela C	12,0 (6,7-24,0)	29,1 (16,8-40,2)	24,1 (13,7-39,3)
		Mann-Whitney U test	U=128,00; p=0,301	U=1207,50; p=0,902	U=95,50; p=0,811
BDNF	rs56164415	C	9,2 (5,8-16,0)	27,2 (16,7-38,4)	23,7 (9,5-41,0)
		Nosioci alela T	15,5 (15,2-25,6)	33,0 (19,4-43,0)	26,5 (15,6-33,3)
		Mann-Whitney U test	U=22,00; p=0,101	U=568,50; p=0,548	U=92,0; p=0,704
BDNF	rs7934165	AA	6,4 (5,0-11,8)	27,6 (17,6-37,0)	10,2 (5,6-38,2)
		AG	13,7 (7,9-18,0)	27,0 (17,7-38,4)	27,5 (16,8-41,0)
		GG	6,7 (6,7-18,0)	30,2 (18,0-42,5)	25,3 (12,3-34,1)
		Kruskal-Wallisov test (df=2)	H=4,64; p=0,098	H=0,44; p=803	H=2,18; p=0,336
TrkB	rs1439050	GG	9,3 (6,8-15,6)	25,9 (16,0-38,3)	23,7 (11,8-30,6)
		GT	11,1 (5,8-17,7)	30,0 (19,2-40,2)	34,8 (7,4-41,0)
		TT	9,7 (4,8-16,5)	32,3 (17,5-42,6)	28,5 (13,2-38,6)
		Kruskal-Wallisov test (df=2)	H=0,26; p=0,879	H=0,94; p=0,627	H=0,31; p=0,855

AB, Alzheimerova bolest; BDNF, moždani neurotrofni čimbenik; MCI, blagi kognitivni (spoznajni) poremećaj; SNP, polimorfizam jedne baze; TrkB, tropomiozin-receptor-kinaza B.

U slučaju polimorfizma rs56164415 analizirana je dodatno povezanost s brojem bodova na podskali ADAS-Cog uzimajući u obzir i spol ispitanika. Rezultat višestruke linearne regresije (korigirani $R^2=0,08$; $F=3,76$; $p=0,006$) pokazuje da polimorfizam rs56164415 (nezavisna varijabla) ne utječe značajno (koeficijent=1,567; $t=0,37$; $p=0,712$) na broj bodova na skali ADAS-Cog (zavisna varijabla) niti nakon korekcije za spol, dijagnozu i dob.

Kako bi dodatno ispitali povezanost kognitivnih simptoma, određenih prema broju bodova na skali ADAS-Cog, i polimorfizama gena BDNF i TrkB, svi ispitanici su podijeljeni na osobe s brojem bodova <18 (manje kognitivno oštećenje) i ispitanike s brojem bodova ≥ 18 (značajnije kognitivno oštećenje).

Usporedba svih ispitanika zajedno, bez obzira na dijagnozu, podijeljenih u kategorije prema broju bodova na skali ADAS-Cog, pokazuje da nema povezanosti između stupnja kognitivnog oštećenja prema ovoj skali i polimorfizama gena BDNF i TrkB: rs1519480 ($\chi^2=0,08$; $df=1$; $p=0,780$), rs6265 ($\chi^2=0,53$; $df=1$; $p=0,467$), rs11030104 ($\chi^2=1,02$; $df=1$; $p=0,314$), rs56164415 ($\chi^2=2,24$; $df=1$; $p=0,134$),

rs7934165 ($\chi^2=4,08$; $df=2$; $p=0,130$), rs1439050 ($\chi^2=0,25$; $df=2$; $p=0,883$). U slučaju polimorfizma rs56164415 razlika nije vidljiva niti nakon podjele na muške ispitanike ($\chi^2=1,05$; $df=1$; $p=0,306$) i ženske ispitanice ($\chi^2=0,41$; $df=1$; $p=0,523$).

4.3.2.4. Polimorfizmi gena za moždani neurotrofni čimbenik te tropomiozin-receptor-kinazu B i klinička skala za rangiranje demencije

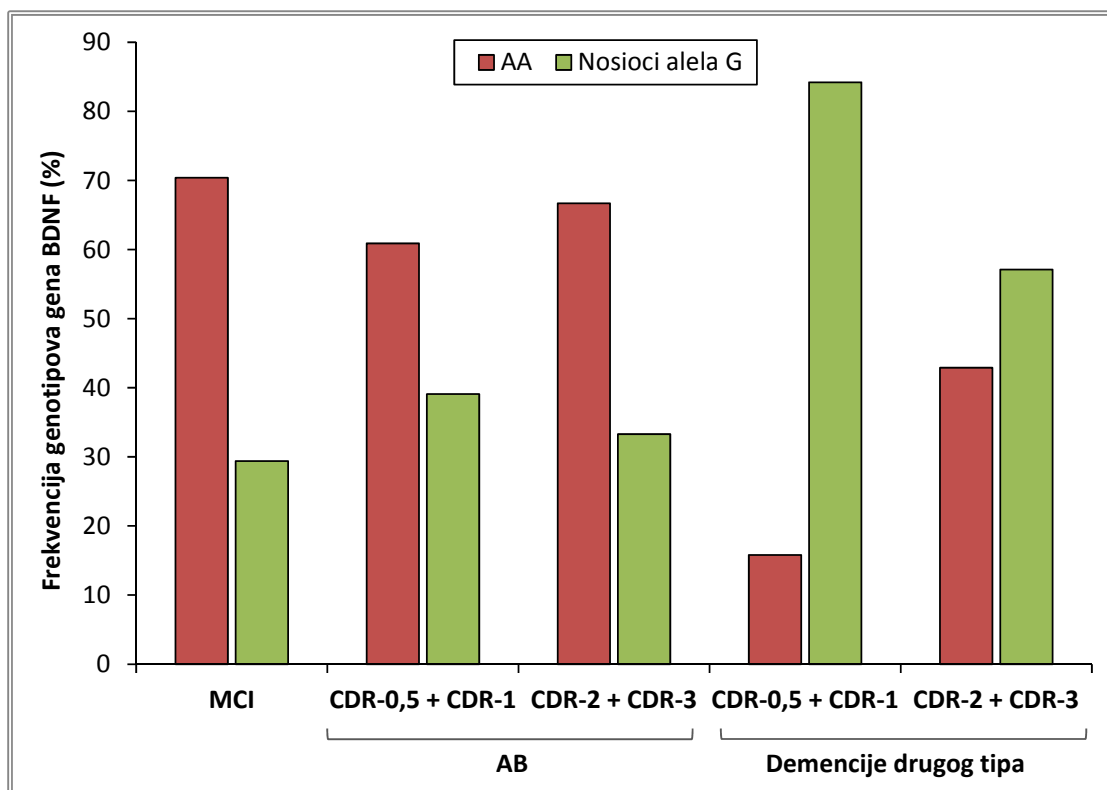
Povezanost ukupnog ranga na skali CDR i polimorfizama gena BDNF i TrkB određena je za svaki istraživani polimorfizam zasebno, bez obzira na dijagnozu, uspoređivanjem distribucije pojedinih genotipova u skupinama ispitanika podijeljenih prema CDR rangu. Usporedba svih ispitanika zajedno, bez obzira na dijagnozu, podijeljenih u kategorije prema rangu na skali CDR, pokazuje da nema značajne povezanosti između stupnja kognitivnog oštećenja prema ovoj skali i polimorfizama gena BDNF i TrkB: rs1519480 ($\chi^2=7,03$; $df=4$; $p=0,134$), rs6265 ($\chi^2=2,46$; $df=4$; $p=0,651$), rs11030104 ($\chi^2=1,54$; $df=4$; $p=0,821$), rs56164415 ($\chi^2=2,85$; $df=4$; $p=0,583$), rs7934165 ($\chi^2=4,98$; $df=8$; $p=0,760$), rs1439050 ($\chi^2=9,55$; $df=8$; $p=0,298$). U slučaju polimorfizma rs56164415 razlika nije vidljiva niti nakon podjele na muške ispitanike ($\chi^2=2,47$; $df=4$; $p=0,650$) i ženske ispitanice ($\chi^2=1,42$; $df=4$; $p=0,841$).

Zbog malog broja ispitanika u pojedini skupinama koje su definirane prema CDR rangu, ispitanici s dijagnozom demencije kombinirani su i podijeljeni na iduće podskupine:

- CDR-0,5 i CDR-1 = vrlo blagi do blagi oblik demencije,
- CDR-2 i CDR-3= umjereni i teški oblik demencije.

Ispitanici s dijagnozom MCI-a nalaze se svi unutar skupine ispitanika s CDR rangom od 0,5 do 1. Dodatna usporedba skupina ispitanika s AB-om, s MCI-em ili dijagnozom ostalih tipova demencija, koje su podijeljene na kategorije prema CDR rangu na gore navedene dvije podskupine, ukazuje da nema značajne razlike u distribuciji genotipova između istraživanih skupina s obzirom na polimorfizme rs6265 ($\chi^2=6,61$; $df=4$; $p=0,158$), rs11030104 ($\chi^2=9,00$; $df=4$; $p=0,061$), rs56164415 ($\chi^2=6,55$; $df=4$; $p=0,162$), rs7934165 ($\chi^2=8,47$; $df=8$; $p=0,389$), rs1439050 ($\chi^2=9,71$; $df=8$; $p=0,286$). U slučaju polimorfizma rs56164415 razlika nije vidljiva niti nakon podjele na muške ispitanike ($\chi^2=5,37$; $df=4$; $p=0,251$) i ženske ispitanice ($\chi^2=0,88$; $df=4$; $p=0,927$).

U slučaju polimorfizma rs1519480 gena BDNF, usporedba skupina ispitanika s AB-om, s MCI-em ili dijagnozom ostalih tipova demencija, koje su podijeljene na kategorije prema CDR-rangu na gore navedene dvije podskupine, pokazuje značajnu razliku u distribuciji genotipova ($\chi^2=16,05$; $df=4$; $p=0,003$) koja je prvenstveno posljedica značajno većeg udjela nosioca alela G ($R=2,57$) kod ispitanika s blažim oblikom demencije unutar istraživane skupine s dijagnozom demencija drugog tipa, u odnosu na ostale istraživane skupine (Slika 33).



Slika 33. Distribucija genotipova s obzirom na polimorfizam 1519480 gena za moždani neurotrofni čimbenik (BDNF) kod ispitanika s dijagnozom blagog kognitivnog (spoznajnog) poremećaja (MCI), ispitanika s dijagnozom ostalih tipova demencija te ispitanika s dijagnozom Alzheimerove bolesti (AB) koji su svi dodatno podijeljeni prema rangu kliničke skale za rangiranje demencija (CDR) na podskupine: CDR-0,5 + CDR-1 (vrlo blagi do blagi oblik demencije) i CDR-2 + CDR-3 (umjereni i teški oblik demencije).

4.3.3. Polimorfizmi gena za moždani neurotrofni čimbenik i tropomiozin-receptor-kinazu B u bihevioralnim i psihološkim simptomima demencije

Kako bi se provjerilo postoji li povezanost BPSD-a s različitim polimorfizmima gena BDNF i TrkB korištena je metoda višestruke linearne regresije. Za navedenu analizu svi ispitanici su podijeljeni prema genotipu s obzirom na istraživane polimorfizme (nezavisna varijabla), a model je korigiran za utjecaj spola i dobi. Kao zavisna varijabla u višestrukoj regresijskoj analizi korišten je ukupan broj bodova na skali NPI te na pojedinim domenama ove skale (NPI-A do NPI-L) ili broj bodova na skali BEHAVE-AD.

U svim tablicama prikazani su rezultati višestruke linearne regresije na način da je prikazan rezultat za ukupni model koji je korigiran za utjecaj spola i dobi te je zasebno prikazan rezultat koji se odnosi na analizirane polimorfizme. U tablicama je vidljivo da su pojedini modeli značajni, ali ne zbog utjecaja istraživanog polimorfizma već zbog utjecaja drugih varijabli za koje su modeli korigirani.

4.3.3.1. Polimorfizmi gena za moždani neurotrofni čimbenik i tropomiozin-receptor-kinazu B te skala neuropsihijatrijski inventar

Polimorfizam rs1519480 gena za moždani neurotrofni čimbenik i skala neuropsihijatrijski inventar

Rezultati višestruke linearne regresije koja ispituje utjecaj polimorfizma rs1519480 gena BDNF na ozbiljnost simptoma koje evaluira NPI, pokazuju da postoji značajna razlika u broju bodova vezanih za domenu NPI-D (depresija/disforija) između ispitanika s genotipom AA u odnosu na nosioce alela G, ali sam model višestruke linearne regresije nije značajan nakon korekcije za spol i dob (Tablica 32). U slučaju ukupnog broja bodova na skali NPI te broja bodova vezanih za ostale domene NPI-a ne postoji značajan utjecaj polimorfizma rs1519480 (Tablica 32).

Tablica 32. Utjecaj polimorfizma rs1519480 gena za moždani neurotrofni čimbenik na broj bodova na neuropsihijatrijskom inventaru.

NPI	rs1519480			Model višestruke linearne regresije		
	Koeficijent	t	p	Korigirani R ²	F	p
NPI-ukupno	-1,147	-0,80	0,424	0,025	2,97	0,033
NPI-A: deluzije	-0,186	-0,56	0,576	0,045	2,57	0,059
NPI-B: halucinacije	0,492	1,94	0,055	0,074	3,64	0,015
NPI-C: agitacija/agresija	-0,111	-0,37	0,711	0,002	1,07	0,366
NPI-D: depresija/disforija	-0,936	-2,12	0,036	0,018	1,91	0,131
NPI-E: anksioznost	-0,823	-1,47	0,144	0,007	1,35	0,261
NPI-F: ushićenje/euforija	0,158	0,72	0,476	0,010	1,51	0,213
NPI-G: apatija/ravnodušnost	0,237	0,44	0,661	0,038	2,98	0,034
NPI-H: dezinhibicija	-0,151	-0,54	0,590	-0,010	0,49	0,688
NPI-I: razdražljivost/labilnost	-0,444	-0,95	0,343	-0,010	0,50	0,680
NPI-J: aberantno motoričko ponašanje	0,264	0,61	0,541	-0,013	0,37	0,778
NPI-K: poremećaji spavanja i noćni nemir	-0,675	-1,86	0,066	0,051	2,78	0,045
NPI-L: poremećaji prehrane i apetita	0,502	1,32	0,190	-0,011	0,63	0,596

Svi modeli višestruke linearne regresije su korigirani za utjecaj spola i dobi.

NPI, neuropsihijatrijski inventar

Polimorfizam rs6265 gena za moždani neurotrofni čimbenik i skala neuropsihijatrijski inventar

U slučaju polimorfizma rs6265 gena BDNF, rezultati višestruke linearne regresije pokazuju da ne postoji značajna razlika u ukupnom broju bodova na skali NPI te u broju bodova na pojedinim domenama NPI-a između ispitanika s genotipom GG u odnosu na nosioce alela A s obzirom na polimorfizam rs6265 gena BDNF, nakon korekcije za spol i dob (Tablica 33).

Tablica 33. Utjecaj polimorfizma rs6265 gena za moždani neurotrofni čimbenik na broj bodova na neuropsihijatrijskom inventaru.

NPI	rs6265			Model višestruke linearne regresije		
	Koeficijent	t	p	Korigirani R ²	F	p
NPI-ukupno	0,908	0,58	0,560	0,024	2,86	0,038
NPI-A: deluzije	0,137	0,40	0,693	0,043	2,51	0,063
NPI-B: halucinacije	-0,074	-0,28	0,782	0,038	2,32	0,080
NPI-C: agitacija/agresija	0,136	0,44	0,664	0,003	1,09	0,358
NPI-D: depresija/disforija	0,051	0,11	0,914	-0,012	0,40	0,752
NPI-E: anksioznost	0,088	0,15	0,883	-0,008	0,63	0,597
NPI-F: ushićenje/euforija	-0,068	-0,29	0,771	0,007	1,37	0,255
NPI-G: apatija/ravnodušnost	0,716	1,27	0,207	0,048	3,48	0,018
NPI-H: dezinhibicija	0,424	1,44	0,151	0,002	1,10	0,353
NPI-I: razdražljivost/labilnost	-0,466	-0,94	0,346	-0,010	0,50	0,683
NPI-J: aberantno motoričko ponašanje	-0,053	-0,12	0,907	-0,016	0,24	0,865
NPI-K: poremećaji spavanja i noćni nemir	-0,135	-0,35	0,727	0,018	1,62	0,189
NPI-L: poremećaji prehrane i apetita	0,111	0,28	0,782	-0,028	0,07	0,973

Svi modeli višestruke linearne regresije su korigirani za utjecaj spola i dobi.

NPI, neuropsihijatrijski inventar

Polimorfizam rs11030104 gena za moždani neurotrofni čimbenik i skala neuropsihijatrijski inventar

Rezultati višestruke linearne regresije koji se odnose na utjecaj polimorfizma rs11030104 gena BDNF na ukupan broj bodova na skali NPI te broj bodova vezan za pojedine domene NPI-a pokazuju da nema značajne razlike u ozbiljnosti simptoma koje analizira skala NPI između ispitanika s genotipom TT u odnosu na nosioce alela C, nakon korekcije za spol i dob (Tablica 34).

Tablica 34. Utjecaj polimorfizma rs11030104 gena za moždani neurotrofni čimbenik na broj bodova na neuropsihijatrijskom inventaru.

NPI	rs11030104			Model višestruke linearne regresije		
	Koeficijent	t	p	Korigirani R ²	F	p
NPI-ukupno	0,456	0,31	0,758	0,023	2,78	0,042
NPI-A: deluzije	0,059	0,18	0,857	0,042	2,47	0,067
NPI-B: halucinacije	-0,189	-0,74	0,463	0,043	2,49	0,065
NPI-C: agitacija/agresija	0,243	0,82	0,416	0,007	1,25	0,295
NPI-D: depresija/disforija	-0,049	-0,11	0,914	-0,012	0,40	0,752
NPI-E: anksioznost	0,126	0,22	0,825	-0,007	0,64	0,592
NPI-F: ushićenje/euforija	-0,059	-0,27	0,791	0,007	1,36	0,257
NPI-G: apatija/ravnodušnost	0,765	1,42	0,158	0,050	3,62	0,015
NPI-H: dezinhibicija	0,324	1,15	0,250	-0,003	0,842	0,473
NPI-I: razdražljivost/labilnost	-0,470	-1,00	0,320	-0,010	0,53	0,659
NPI-J: aberantno motoričko ponašanje	-0,359	-0,83	0,409	-0,011	0,47	0,703
NPI-K: poremećaji spavanja i noćni nemir	-0,059	-0,16	0,874	0,017	1,589	0,197
NPI-L: poremećaji prehrane i apetita	0,086	0,23	0,822	-0,029	0,07	0,978

Svi modeli višestruke linearne regresije su korigirani za utjecaj spola i dobi.

NPI, neuropsihijatrijski inventar

Polimorfizam rs56164415 gena za moždani neurotrofni čimbenik i skala neuropsihijatrijski inventar

Rezultati višestruke linearne regresije koja ispituje utjecaj polimorfizma rs56164415 gena BDNF na ozbiljnost simptoma koje evaluira NPI, pokazuju da ne postoji značajna razlika u ukupnom broju bodova na skali NPI te u broju bodova vezanim za pojedine domene NPI-a između ispitanika s genotipom CC u odnosu na nosioce alela T, nakon korekcije za spol i dob (Tablica 35).

Tablica 35. Utjecaj polimorfizma rs56164415 gena za moždani neurotrofni čimbenik na broj bodova na neuropsihijatrijskom inventaru.

NPI	rs56164415			Model višestruke linearne regresije		
	Koeficijent	t	p	Korigirani R ²	F	p
NPI-ukupno	-2,626	-1,32	0,191	0,030	3,34	0,020
NPI-A: deluzije	0,144	0,31	0,755	0,043	2,49	0,065
NPI-B: halucinacije	0,385	1,08	0,283	0,049	2,71	0,049
NPI-C: agitacija/agresija	-0,140	-0,34	0,737	0,002	1,06	0,369
NPI-D: depresija/disforija	-0,535	-0,88	0,378	-0,007	0,66	0,578
NPI-E: anksioznost	-0,990	-1,30	0,195	0,004	1,19	0,315
NPI-F: ushićenje/euforija	-0,157	-0,52	0,600	0,009	1,43	0,236
NPI-G: apatija/ravnodušnost	-0,412	-0,56	0,573	0,039	3,02	0,032
NPI-H: dezinhibicija	-0,550	-1,43	0,146	0,002	1,11	0,346
NPI-I: razdražljivost/labilnost	-1,009	-1,61	0,109	0,001	1,07	0,363
NPI-J: aberantno motoričko ponašanje	-0,750	-1,29	0,198	-0,004	0,80	0,495
NPI-K: poremećaji spavanja i noćni nemir	-0,149	-0,29	0,773	0,018	1,61	0,192
NPI-L: poremećaji prehrane i apetita	-0,260	-0,49	0,626	-0,027	0,13	0,943

Svi modeli višestruke linearne regresije su korigirani za utjecaj spola i dobi.

NPI, neuropsihijatrijski inventar

Polimorfizam rs7934165 gena za moždani neurotrofni čimbenik i skala neuropsihijatrijski inventar

U slučaju polimorfizma rs7934165 gena BDNF, rezultati višestruke linearne regresije pokazuju da postoji značajna razlika u broju bodova vezanih za domenu NPI-G (apatija/ravnodušnost) između ispitanika s različitim genotipovima (AA, AG, GG) s obzirom na spomenuti polimorfizam, nakon korekcije za spol i dob (Tablica 36). Navedeni model je zaslužan za 8,6% varijacije u broju bodova u domeni NPI-G. U slučaju ukupnog broja bodova na skali NPI te broja bodova vezanih za ostale domene NPI-a ne postoji značajna razlika između ispitanika podijeljenima prema genotipu s obzirom na polimorfizam rs7934165.

Tablica 36. Utjecaj polimorfizma rs7934165 gena za moždani neurotrofni čimbenik na broj bodova na neuropsihijatrijskom inventaru.

NPI	rs7934165			Model višestruke linearne regresije		
	Koeficijent	t	p	Korigirani R ²	F	p
NPI-ukupno	-0,777	-0,76	0,449	0,025	2,95	0,034
NPI-A: deluzije	-0,393	-1,63	0,107	0,067	3,41	0,021
NPI-B: halucinacije	-0,042	-0,22	0,825	0,038	2,32	0,081
NPI-C: agitacija/agresija	-0,050	-0,23	0,821	0,001	1,04	0,379
NPI-D: depresija/disforija	-0,265	-0,82	0,414	-0,008	0,62	0,601
NPI-E: anksioznost	-0,279	-0,68	0,496	-0,004	0,78	0,507
NPI-F: ushićenje/euforija	0,066	0,41	0,682	0,008	1,40	0,246
NPI-G: apatija/ravnodušnost	1,053	2,77	0,006	0,086	5,62	0,001
NPI-H: dezinhibicija	-0,062	-0,31	0,761	-0,012	0,43	0,735
NPI-I: razdražljivost/labilnost	-0,479	-1,43	0,155	0,018	0,88	0,451
NPI-J: aberantno motoričko ponašanje	-0,091	-0,29	0,770	-0,015	0,27	0,848
NPI-K: poremećaji spavanja i noćni nemir	-0,492	-1,83	0,070	0,050	2,75	0,047
NPI-L: poremećaji prehrane i apetita	0,355	1,26	0,210	-0,013	0,58	0,629

Svi modeli višestruke linearne regresije su korigirani za utjecaj spola i dobi.

NPI, neuropsihijatrijski inventar.

Kako bi dodatno ispitali povezanost simptoma apatije/ravnodušnosti s polimorfizmom rs7934165 svi su ispitanici podijeljeni prema broju bodova u NPI-G domeni na osobe s 0 (bez simptoma/poremećaja) i ispitanike s brojem bodova ≥ 1 (sa simptomima/poremećajem). Rezultat pokazuje da nema značajne razlike u raspodjeli genotipova između skupina ispitanika podijeljenih prema broju bodova u NPI-G domeni ($\chi^2=3,24$; $df=2$; $p=0,198$).

Polimorfizam rs1439050 gena za tropomiozin-receptor-kinazu B i skala neuropsihijatrijski inventar

Rezultati višestruke linearne regresije koji se odnose na utjecaj polimorfizma rs1439050 gena TrkB na ukupan broj bodova na skali NPI te broj bodova vezan za pojedine domene NPI-a pokazuju da nema značajne razlike u ozbiljnosti simptoma koje analizira skala NPI između ispitanika s genotipom GG, GT i TT, nakon korekcije za spol i dob (Tablica 37).

Tablica 37. Utjecaj polimorfizma rs1439050 gena za tropomiozin-receptor-kinazu B na broj bodova na neuropsihijatrijskom inventaru.

NPI	rs1439050			Model višestruke linearne regresije		
	Koeficijent	t	p	Korigirani R ²	F	p
NPI-ukupno	0,056	0,06	0,956	0,023	2,75	0,044
NPI-A: deluzije	0,051	0,22	0,827	0,042	2,47	0,066
NPI-B: halucinacije	0,224	1,26	0,212	0,053	2,86	0,041
NPI-C: agitacija/agresija	0,109	0,52	0,601	0,003	1,12	0,346
NPI-D: depresija/disforija	-0,220	-0,69	0,489	-0,009	0,56	0,642
NPI-E: anksioznost	0,184	0,46	0,647	-0,006	0,69	0,558
NPI-F: ushićenje/euforija	-0,046	-0,30	0,766	0,007	1,37	0,255
NPI-G: apatija/ravnodušnost	-0,354	-0,93	0,353	0,043	3,22	0,025
NPI-H: dezinhibicija	0,008	0,04	0,966	-0,012	0,40	0,757
NPI-I: razdražljivost/labilnost	0,092	0,28	0,780	-0,016	0,23	0,877
NPI-J: aberantno motoričko ponašanje	-0,091	-0,30	0,765	-0,015	0,27	0,847
NPI-K: poremećaji spavanja i noćni nemir	0,397	1,56	0,122	0,041	2,43	0,070
NPI-L: poremećaji prehrane i apetita	0,144	0,54	0,589	-0,026	0,15	0,931

Svi modeli višestruke linearne regresije su korigirani za utjecaj spola i dobi.

NPI, neuropsihijatrijski inventar.

4.3.3.2. Polimorfizmi gena za moždani neurotrofni čimbenik i tropomiozin-receptor-kinazu B i skala za procjenu bihevioralne patologije u Alzheimerovoj bolesti

Kako bi se provjerilo postoji li povezanost broja bodova na skali BEHAVE-AD (zavisna varijabla) s različitim polimorfizmima gena BDNF i TrkB (nezavisne varijable) korištena je metoda višestruke linearne regresije. Za analizu svi su ispitanici podijeljeni prema genotipovima s obzirom na istraživane polimorfizme, a model je korigiran za utjecaj spola i dobi.

Rezultati višestruke linearne regresije pokazuju da ne postoji značajan utjecaj istraživanih polimorfizama na broj bodova na skali BEHAVE-AD unutar istraživane skupine nakon korekcije za spol i dob (Tablica 38).

Tablica 38. Utjecaj polimorfizama jedne baze gena za moždani neurotrofni čimbenik i tropomiozin-receptor-kinazu B na broj bodova na skali za procjenu bihevioralne patologije u Alzheimerovoj bolesti.

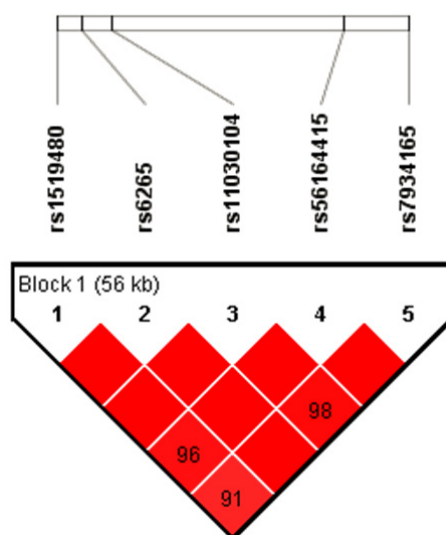
SNP	Nosioци haplotipa			Model višestruke linearne regresije		
	Koeficijent	t	p	Korigirani R ²	F	p
rs1519480	-0,702	-0,19	0,853	0,012	1,19	0,327
rs6265	-3,570	-0,93	0,358	0,031	1,48	0,232
rs11030104	-2,335	-0,64	0,529	0,021	1,32	0,281
rs56164415	7,488	1,42	0,164	0,056	1,90	0,145
rs7934165	-2,508	-0,84	0,408	0,028	1,42	0,249
rs1439050	3,811	1,33	0,192	0,051	1,81	0,160

Svi modeli višestruke linearne regresije su korigirani za utjecaj spola i dobi.

SNP, polimorfizam jedne baze.

4.4. Neravnoteža udruživanja alela i haplotipovi gena za moždani neurotrofni čimbenik

Kako bi provjerili jesu li istraživani polimorfizmi u LD-u, tj. postoje li određene kombinacije alela (haplotip) koje se češće zajedno nasljeđuju koristili smo program Haploview, verzija 4.2 (Broad Institute of Harvard and MIT, SAD) (Barrett i sur., 2005). Za određivanje, tj. prikaz LD-a korišten je standardizirani koeficijent D' . Vrijednosti D' iznad 0,80 označavaju da su dva istraživana polimorfizma u LD-u. Analiza programom Haploview pokazuje da se svih 5 istraživanih polimorfizama nalaze u LD-u (Slika 34).



Slika 34. Prikaz analize neravnoteže udruživanja između polimorfizama gena za moždani neurotrofni čimbenik.

Blokovi neravnoteže udruživanja (LD) označeni su trokutom. Vrijednosti u kvadratima predstavljaju vrijednosti LD-a (D' vrijednosti od 1,0 nisu prikazane) između parova polimorfizama, a pojedini kvadrati su obojani prema standardnoj Haploview shemi: crvena boja, $LD > 2$ i $D' = 1$; nijanse ružičaste/crvene boje, $LD > 2$ i $D' < 1$; plava boja, $LD < 2$ i $D' = 1$; bijela boja, $LD < 2$ i $D' < 1$ (LD se odnosi na logaritamsku vrijednost omjera izgleda).

Analiza programom Haploview identificirala je 6 haplotipova u skupini ispitanika s AB-om, demencijama drugog tipa i MCI-em:

1. AGTCA (frekvencija: 0,489),
2. AACCG (frekvencija: 0,186),
3. GGTCG (frekvencija: 0,180),
4. GGTTG (frekvencija: 0,073),
5. AGCCG (frekvencija: 0,042),
6. AGTCG (frekvencija: 0,018).

Procjena parova haplotipova za svakog pojedinog ispitanika napravljena je pomoću programa PHASE, verzija 2.1.1 (University of Washington, SAD). Program PHASE 2.1.1 identificirao je 6 najčešćih haplotipova kao i program Haploview i još 5 dodatnih haplotipova:

1. AGTCA (frekvencija: 0,489),
2. AACCG (frekvencija: 0,186),
3. GGTCG (frekvencija: 0,180),
4. GGTTG (frekvencija: 0,073),
5. AGCCG (frekvencija: 0,042),
6. AGTCG (frekvencija: 0,019),
7. AGTTA (frekvencija: 0,000),
8. AGTTG (frekvencija: 0,002),
9. AGCCA (frekvencija: 0,001),
10. GGTC A (frekvencija: 0,008),
11. AACTG (frekvencija: 0,000).

U obzir su uzeti parovi haplotipova koji su procijenjeni sa sigurnošću većom od 95% (Tablica 39), a haplotipovi s frekvencijom manjom od 1% nisu uvršteni u daljnje statističke analize.

Tablica 39. Haplotipovi gena za moždani neurotrofni čimbenik koje su identificirali program PHASE 2.1.1 i Haploview s frekvencijom većom od 1%.

Oznaka haplotipa	SNP - Aleli					Frekvencija haplotipa
	rs1519480	rs6265	rs11030104	rs56164415	rs7934165	
H1	A	G	T	C	A	0,489
H2	A	A	C	C	G	0,186
H3	G	G	T	C	G	0,180
H4	G	G	T	T	G	0,073
H5	A	G	C	C	G	0,042
H6	A	G	T	C	G	0,019

SNP, polimorfizam jedne baze.

4.4.1. Haplotipovi gena za moždani neurotrofni čimbenik kod oboljelih od demencije ili blagog kognitivnog (spoznajnog) poremećaja

Skupine ispitanika s dijagnozom AB-a, skupina ispitanika s dijagnozom demencija drugog tipa te skupina kojoj je dijagnosticiran MCI uspoređene su prema frekvenciji pojedinih haplotipova. Rezultati pokazuju da nema značajne razlike u raspodjeli alela između uspoređivanih skupina ispitanika ($p=0,329$) (Tablica 40).

Tablica 40. Distribucija haplotipova gena za moždani neurotrofni čimbenik kod ispitanika s dijagnozom blagog kognitivnog (spoznajnog) poremećaja, ispitanika s dijagnozom Alzheimerove bolesti i ispitanika s dijagnozom ostalih tipova demencija.

Haplotip	MCI	AB	Demencije drugog tipa
	N (%)	N (%)	N (%)
H1 (AGTCA)	67 (57,3)	200 (49,8)	44 (42,3)
H2 (AACCG)	17 (14,5)	84 (20,9)	17 (16,3)
H3 (GGTCG)	21 (17,9)	68 (16,9)	25 (24,0)
H4 (GGTTG)	7 (6,0)	30 (7,5)	10 (9,6)
H5 (AGCCG)	4 (3,4)	19 (4,7)	4 (3,8)
H6 (AGTCG)	1 (0,9)	7 (1,7)	4 (3,8)
X²-test	X²=11,37; df=10; p=0,329		

AB, Alzheimerova bolest; MCI, blagi kognitivni (spoznajni) poremećaj; N, broj ispitanika.

Utjecaj spola na raspodjelu haplotipova testiran je χ^2 -testom na svim ispitanicima zajedno ($X^2=10,37$; $df=5$; $p=0,066$) i nakon podjele prema dijagnostičkim skupinama ($X^2=34,74$; $df=25$; $p=0,093$). Obje analize pokazuju da nema razlike u distribuciji haplotipova po spolu zbog čega su muški i ženski ispitanici dalje analizirani kao cjelovita skupina.

Dodatna usporedba napravljena je uspoređujući frekvenciju svakog pojedinog haplotipa i zbroja ostalih haplotipova po istraživanim skupinama (Tablica 41). Rezultati χ^2 -testa pokazuju da nema značajne razlike u distribuciji alela između istraživanih skupina, ali u slučaju haplotipa H1 (AGTCA) vidljiv je trend koji ukazuje na marginalno veći udio haplotipa H1 kod osoba s dijagnozom MCI-a u odnosu na osobe kojima je dijagnosticirana demencija ($p=0,085$).

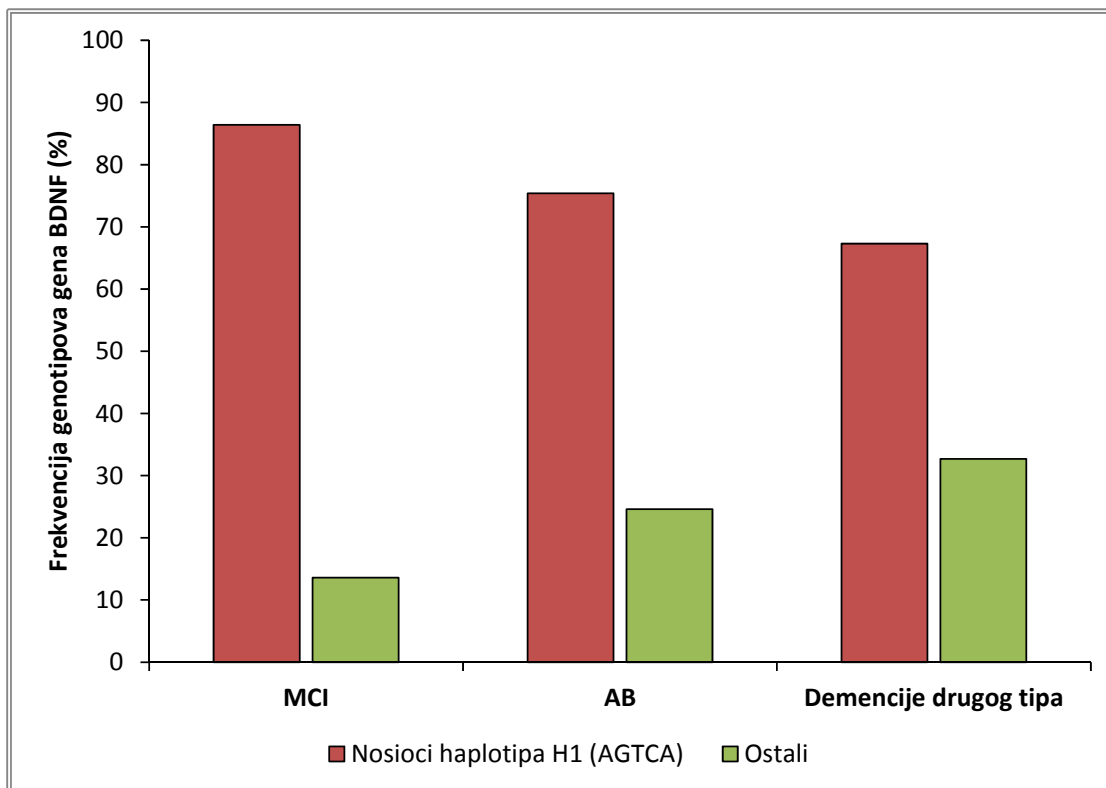
Tablica 41. Distribucija pojedinih haplotipova gena za moždani neurotrofni čimbenik u odnosu na ostale kombinirane haplotipove kod ispitanika s dijagnozom blagog kognitivnog (spoznajnog) poremećaja, ispitanika s dijagnozom Alzheimerove bolesti i ispitanika s dijagnozom ostalih tipova demencija.

Haplotip	MCI	AB	Demencije drugog tipa	X ² -test df=2	
	N (%)	N (%)	N (%)	X ²	p
H1 (AGTCA)	67 (57,3)	200 (49,8)	44 (42,3)	4,94	0,085
ostali	50 (42,7)	202 (50,2)	60 (57,7)		
H2 (AACCG)	17 (14,7)	84 (20,9)	17 (16,3)	2,84	0,242
ostali	99 (85,3)	318 (79,1)	87 (83,7)		
H3 (GGTCG)	21 (18,1)	68 (16,9)	25 (24,0)	2,81	0,246
ostali	95 (81,9)	334 (83,1)	79 (76,0)		
H4 (GGTTG)	7 (6,0)	30 (7,5)	10 (9,6)	1,02	0,600
ostali	109 (94,0)	372 (92,5)	94 (90,4)		
H5 (AGCCG)	4 (3,4)	19 (4,7)	4 (3,8)	0,43	0,807
ostali	112 (96,6)	383 (95,3)	100 (96,2)		
H6 (AGTCG)	1 (0,9)	7 (1,7)	4 (3,8)	2,79	0,247
ostali	115 (99,1)	395 (98,3)	100 (96,2)		

AB, Alzheimerova bolest; MCI, blagi kognitivni (spoznajni) poremećaj; N, broj ispitanika.

Zbog malog broja pojedinih parova haplotipova i s obzirom na trend koji je vidljiv u Tablici 41, ispitanici su kombinirani s obzirom na prisustvo haplotipa H1 u nosioce haplotipa H1 i na ostale ispitanike koji su nosioci drugih haplotipova (Slika 35). Ova usporedba je pokazala da postoji marginalna, ali ne i statistički značajna razlika ($\chi^2= 51,97$; $df=38$, $p=0,065$) u učestalosti nosioca haplotipa H1 između skupina ispitanika kojima je dijagnosticiran AB, ispitanika s dijagnozom drugih tipova demencija te ispitanika s MCI-em (Slika 35).

Ova razlika nije vidljiva ako se ispitanici podijele prema broju haplotipova H1 u osobe koje su H1H1 homozigoti, osobe koje su nosioci jednog haplotipa H1 i osobe koje nisu nosioci ovog haplotipa ($\chi^2= 5,95$; $df=4$; $p=0,203$).



Slika 35. Grafički prikaz distribucije parova haplotipova (genotipova) gena za moždani neurotrofni čimbenik (BDNF) između ispitanika s dijagnozom blagog kognitivnog (spoznajnog) poremećaja (MCI), ispitanika s dijagnozom Alzheimerove bolesti (AB) i ispitanika s dijagnozom ostalih tipova demencija.

4.4.2. Haplotipovi gena za moždani neurotrofni čimbenik i kognitivni simptomi demencije

Kako bi se utvrdio mogući utjecaj haplotipova gena za BDNF na kognitivne simptome demencije, napravljene su analize koristeći metodu višestruke linearne regresije u kojoj je broj bodova na pojedinim kognitivnim testovima uzet kao zavisna varijabla, a pojedini haplotipovi gena za BDNF kao nezavisne varijable. Analiza je provedena za svaki haplotip zasebno tako da su svi ispitanici podijeljeni na nosioce i ne-nosioce određenog haplotipa. Kao ostale nezavisne varijable u modelu višestruke linearne regresije uzete su dijagnoza ispitanika (koji su podijeljeni na ispitanike s dijagnozom MCI-a, ispitanike s dijagnozom AB-a i ispitanika s dijagnozom ostalih tipova demencija), spol i dob. Kako bi se provjerilo postoji li povezanost stupnja demencije, koji je definiran prema skali CDR (zavisna varijabla), s različitim haplotipovima gena BDNF (nezavisna varijabla), korištena je metoda logističke regresije. Za analizu su svi ispitanici podijeljeni s obzirom na prisustvo tj. odsustvo haplotipa (H1-H6), a model je korigiran za utjecaj dijagnoze (AB vs demencije drugog tipa vs MCI), spola i dobi.

U svim tablicama prikazani su rezultati višestruke linearne regresije na način da je prikazan rezultat za ukupni model koji je korigiran za utjecaj spola i dobi te je zasebno prikazan rezultat za analizirane haplotipove. U tablicama je vidljivo da su pojedini modeli značajni, ali ne zbog utjecaja istraživanog haplotipa već zbog utjecaja drugih varijabli za koje su modeli korigirani.

4.4.2.1. Haplotipovi gena za moždani neurotrofni čimbenik i test procjene mentalnog stanja

Rezultati višestruke linearne regresije pokazuju da ne postoji značajna razlika u broju bodova na skali MMSE između nosioca i ne-nosioca određenih haplotipova nakon korekcije za dijagnozu, spol i dob (Tablica 42).

Tablica 42. Utjecaj haplotipova gena za moždani neurotrofni čimbenik na broj bodova na testu procjene mentalnog stanja.

Haplotip	Nosioci haplotipa			Model višestruke linearne regresije		
	Koeficijent	t	p	Korigirani R ²	F	p
H1 (AGTCA)	0,589	0,64	0,521	0,100	7,02	<0,001
H2 (AACCG)	-0,375	-0,44	0,663	0,098	6,95	<0,001
H3 (GGTCG)	0,765	0,93	0,354	0,100	7,14	<0,001
H4 (GGTTG)	0,705	0,64	0,525	0,098	7,01	<0,001
H5 (AGCCG)	-1,275	-0,92	0,358	0,100	7,14	<0,001
H6 (AGTCG)	-2,482	-1,37	0,169	0,105	7,44	<0,001

Svi modeli višestruke linearne regresije su korigirani za utjecaj dijagnoze, spola i dobi.

4.4.2.2. Haplotipovi gena za moždani neurotrofni čimbenik i test crtanja sata

Rezultati višestruke linearne regresije pokazuju da ne postoji značajna razlika u broju CDT bodova između nosioca i ne-nosioca određenih haplotipova nakon korekcije za dijagnozu, spol i dob (Tablica 43), osim u slučaju haplotipa H1 gdje je ta razlika značajna ($p=0,023$) (Tablica 43). Rezultat upućuje na to da je zadani model odgovoran za 3,5% varijacije koja je vidljiva u broju bodova na testu CDT. Pojedini modeli su značajni zbog utjecaja drugih varijabli, za koje su modeli korigirani, na vrijednosti broja bodova na testu CDT (Tablica 43).

Tablica 43. Utjecaj haplotipova gena za moždani neurotrofni čimbenik na broj bodova na testu crtanja sata.

Haplotip	Nosioci haplotipa			Model višestruke linearne regresije		
	Koeficijent	t	p	Korigirani R ²	F	p
H1 (AGTCA)	0,981	2,30	0,023	0,035	2,61	0,038
H2 (AACCG)	-0,320	-0,77	0,444	0,009	1,40	0,235
H3 (GGTCG)	-0,307	-0,80	0,427	0,009	1,41	0,232
H4 (GGTTG)	0,514	0,98	0,327	0,011	1,50	0,205
H5 (AGCCG)	-1,256	-1,86	0,065	0,025	2,14	0,078
H6 (AGTCG)	-0,669	-0,74	0,459	0,009	1,39	0,239

Svi modeli višestruke linearne regresije su korigirani za utjecaj dijagnoze, spola i dobi.

4.4.2.3. Haplotipovi gena za moždani neurotrofni čimbenik i skala procjene Alzheimerove bolesti - kognitivna podskala

Rezultati višestruke linearne regresije pokazuju da ne postoji značajna razlika u broju bodova na skali ADAS-Cog između nosioca i ne-nosioca većine istraživanih haplotipova nakon korekcije za dijagnozu, spol i dob (Tablica 44). U slučaju haplotipa H6 pokazano je da postoji značajna razlika u broju ADAS-Cog bodova između nosioca i ne-nosioca ovog haplotipa nakon korekcije s obzirom na dijagnozu, dob i spol ($p=0,040$) (Tablica 44). Rezultat upućuje na to da je zadani model odgovoran za 11,2% varijacije koja je vidljiva u broju bodova na skali ADAS-Cog.

Tablica 44. Utjecaj haplotipova gena za moždani neurotrofni čimbenik na broj bodova na skali procjene Alzheimerove bolesti - kognitivna podskala.

Haplotip	Nosioci haplotipa			Model višestruke linearne regresije		
	Koeficijent	t	p	Korigirani R ²	F	p
H1 (AGTCA)	-5,690	-1,69	0,093	0,101	4,53	0,002
H2 (AACCG)	0,945	0,29	0,772	0,081	3,75	0,007
H3 (GGTCG)	-0,011	-0,00	0,997	0,080	3,72	0,007
H4 (GGTTG)	1,547	0,37	0,712	0,081	3,76	0,006
H5 (AGCCG)	7,558	1,39	0,168	0,094	4,26	0,003
H6 (AGTCG)	15,535	2,07	0,040	0,112	4,93	0,001

Svi modeli višestruke linearne regresije su korigirani za utjecaj dijagnoze, spola i dobi.

4.4.2.4. Haplotipovi gena za moždani neurotrofni čimbenik i klinička skala za rangiranje demencije

Zbog malog broja ispitanika u pojedini skupinama koje su definirane prema CDR rangu, ispitanici s dijagnozom demencije kombinirani su i podijeljeni na iduće podskupine:

- CDR-0,5 i CDR-1 = vrlo blagi do blagi oblik demencije,
- CDR-2 i CDR-3= umjereni i teški oblik demencije.

Ispitanici s dijagnozom MCI-a nalaze se svi unutar skupine ispitanika s CDR rangom od 0,5 do 1.

Rezultati logističke regresije pokazuju da ne postoji značajna razlika u stupnju demencije prema skali CDR između nosioca i ne-nosioca određenih haplotipova nakon korekcije za dijagnozu, spol i dob (Tablica 45). U slučaju haplotipa H6 izračun nije mogao biti proveden zbog malog broja nosioca haplotipa H6 u pojedini podskupinama.

Tablica 45. Utjecaj haplotipova gena za moždani neurotrofni čimbenik na stupanj demencije prema kliničkoj skali za rangiranje demencije.

Haplotip	Nosioci haplotipa			Model logističke regresije		
	Koeficijent	SE	p	OR (95% CI)	X ² (df=5)	p
H1 (AGTCA)	0,413	0,878	0,638	1,512 (0,270-8,458)	11,18	0,048
H2 (AACCG)	1,436	0,914	0,116	4,205 (0,701-25,241)	13,56	0,019
H3 (GGTCG)	0,775	0,641	0,081	1,921 (0,421-8,775)	11,67	0,040
H4 (GGTTG)	-18,558	2918,278	0,995	0,000 (0,000-0,000)	16,90	0,005
H5 (AGCCG)	-18,365	3994,218	0,996	0,000 (0,000-0,000)	14,02	0,016

Svi modeli logističke regresije su korigirani za utjecaj dijagnoze, spola i dobi.

4.4.3. Haplotipovi gena za moždani neurotrofni čimbenik te bihevioralni i psihološki simptomi demencije

Kako bi se provjerilo postoji li povezanost BPSD-a s različitim haplotipovima gena BDNF korištena je metoda višestruke linearne regresije. Za analizu su svi ispitanici podijeljeni s obzirom na prisustvo tj. odsustvo istraživanog haplotipa (H1-H6) (nezavisna varijabla), a model je korigiran za utjecaj spola i dobi. Kao zavisna varijabla u višestrukoj regresijskoj analizi korišten je ukupan broj bodova na skali NPI te na pojedinim domenama ove skale (NPI-A do NPI-L), tj. ukupan broj bodova na skali BEHAVE-AD.

U svim tablicama prikazani su rezultati višestruke linearne regresije na način da je prikazan rezultat za ukupni model koji je korigiran za utjecaj spola i dobi te je zasebno prikazan rezultat za analizirane haplotipove. U tablicama je vidljivo da su pojedini modeli značajni, ali ne zbog utjecaja istraživog polimorfizma već zbog utjecaja drugih varijabli za koje su modeli korigirani.

4.4.3.1. Haplotipovi gena za moždani neurotrofni čimbenik i neuropsihijatrijski inventar

Haplotip H1 (AGTCA) gena BDNF i skala neuropsihijatrijski inventar

Rezultati višestruke linearne regresije u slučaju haplotipa H1 pokazuju da postoji značajna razlika u broju bodova vezanih za domenu NPI-A (deluzije) i domenu NPI-G (apatija/ravnodušnost) između nosioca i ne-nosioca haplotipa H1 nakon korekcije za spol i dob (Tablica 46).

Tablica 46. Utjecaj haplotipa H1 gena za moždani neurotrofni čimbenik na broj bodova na neuropsihijatrijskom inventaru.

NPI	Nosioci haplotipa H1 (AGTCA)			Model višestruke linearne regresije		
	Koeficijent	t	p	Korigirani R ²	F	p
NPI-ukupno	1,763	1,06	0,291	0,028	3,13	0,026
NPI-A: deluzije	0,988	2,37	0,020	0,094	4,48	0,005
NPI-B: halucinacije	0,501	1,52	0,132	0,060	3,12	0,030
NPI-C: agitacija/agresija	0,488	1,27	0,206	0,017	1,58	0,199
NPI-D: depresija/disforija	0,381	0,72	0,474	-0,009	0,57	0,634
NPI-E: anksioznost	0,270	0,40	0,687	-0,006	0,677	0,568
NPI-F: ushićenje/euforija	-0,192	-0,74	0,462	0,011	1,52	0,211
NPI-G: apatija/ravnodušnost	-1,845	-2,98	0,003	0,093	6,04	0,001
NPI-H: dezinhibicija	0,320	0,97	0,335	-0,006	0,71	0,548
NPI-I: razdražljivost/labilnost	0,354	0,64	0,523	-0,014	0,338	0,798
NPI-J: aberantno motoričko ponašanje	0,029	0,06	0,995	-0,016	0,24	0,867
NPI-K: poremećaji spavanja i noćni nemir	0,868	1,84	0,068	0,050	2,77	0,046
NPI-L: poremećaji prehrane i apetita	-0,583	-1,18	0,240	-0,015	0,52	0,672

Svi modeli višestruke linearne regresije su korigirani za utjecaj spola i dobi. NPI, neuropsihijatrijski inventar.

Rezultat upućuje na to da je zadani model odgovoran za 9,4% varijacije koja je vidljiva u broju bodova na domeni NPI-A te 9,3% varijacije u domeni NPI-G.

Kako bi dodatno ispitali povezanost simptoma deluzija te apatije/ravnodušnosti s haplotipom H1 svi su ispitanici podijeljeni prema broju bodova vezanih uz domene NPI-A i NPI-G na osobe s 0 (bez simptoma/poremećaja) i ispitanike s brojem bodova ≥ 1 (sa simptomima/poremećajem). Rezultat pokazuje da nema značajne razlike u raspodjeli nosioca haplotipa H1 i ostalih genotipova između skupina ispitanika podijeljenih prema broju bodova na domeni NPI-A ($\chi^2=0,74$; $df=1$; $p=0,391$) i NPI-G ($\chi^2=2,15$; $df=1$; $p=0,143$).

Haplotip H2 (AACCG) gena BDNF i skala neuropsihijatrijski inventar

Rezultati višestruke linearne regresije, koja uspoređuje ukupan broj bodova na skali NPI te broj bodova vezanih za pojedine domene skale, između nosioca i ne-nosioca haplotipa H2, pokazuje da haplotip H2 nema značajan utjecaj na ozbiljnost simptoma koje evaluira NPI nakon korekcije za spol i dob (Tablica 47).

Tablica 47. Utjecaj haplotipa H2 gena za moždani neurotrofni čimbenik na broj bodova na neuropsihijatrijskom inventaru.

NPI	Nosioци haplotipa H2 (AACCG)			Model višestruke linearne regresije		
	Koeficijent	t	p	Korigirani R ²	F	p
NPI-ukupno	0,908	0,58	0,560	0,024	2,86	0,038
NPI-A: deluzije	0,137	0,40	0,693	0,043	2,51	0,063
NPI-B: halucinacije	-0,074	-0,28	0,782	0,038	2,32	0,080
NPI-C: agitacija/agresija	0,136	0,44	0,664	0,003	1,09	0,358
NPI-D: depresija/disforija	0,051	0,11	0,914	-0,012	0,40	0,752
NPI-E: anksioznost	0,088	0,15	0,883	-0,008	0,63	0,597
NPI-F: ushićenje/euforija	-0,068	-0,29	0,771	0,007	1,37	0,255
NPI-G: apatija/ravnodušnost	0,716	1,27	0,207	0,048	3,48	0,018
NPI-H: dezinhibicija	0,424	4,44	0,151	0,002	1,10	0,353
NPI-I: razdražljivost/labilnost	-0,466	-0,94	0,346	-0,010	0,50	0,683
NPI-J: aberantno motoričko ponašanje	-0,053	-0,61	0,541	-0,016	0,24	0,865
NPI-K: poremećaji spavanja i noćni nemir	-0,135	-0,35	0,727	0,018	1,62	0,189
NPI-L: poremećaji prehrane i apetita	0,111	0,28	0,782	-0,028	0,075	0,973

Svi modeli višestruke linearne regresije su korigirani za utjecaj spola i dobi.

NPI, neuropsihijatrijski inventar.

Haplotip H3 (GGTCG) gena BDNF i skala neuropsihijatrijski inventar

Rezultati višestruke linearne regresije pokazuju da postoji značajna razlika u broju bodova vezanih za domenu NPI-K (poremećaji spavanja i noćni nemir) između nosioca i ne-nosioca haplotipa H3 nakon korekcije za spol i dob (Tablica 48). Rezultat upućuje na to da je zadani model odgovoran za 7,4% varijacije koja je vidljiva u broju bodova na domeni NPI-K. Rezultati pokazuju i da postoji značajna razlika u broju bodova vezanih za domenu NPI-L (poremećaji prehrane i apetita) između nosioca i ne-nosioca haplotipa H3, ali model višestruke linearne regresije nije značajan nakon korekcije za spol i dob (Tablica 48).

Tablica 48. Utjecaj haplotipa H3 gena za moždani neurotrofni čimbenik na broj bodova na neuropsihijatrijskom inventaru.

NPI	Nosioci haplotipa H3 (GGTCG)			Model višestruke linearne regresije		
	Koeficijent	t	p	Korigirani R ²	F	p
NPI-ukupno	-0,592	-0,40	0,693	0,036	2,80	0,041
NPI-A: deluzije	-0,498	-1,38	0,170	0,060	3,14	0,029
NPI-B: halucinacije	0,100	0,34	0,731	0,039	2,34	0,078
NPI-C: agitacija/agresija	-0,170	-0,51	0,610	0,003	1,11	0,348
NPI-D: depresija/disforija	-0,712	-1,50	0,136	0,003	1,16	0,329
NPI-E: anksioznost	-0,460	-0,76	0,446	-0,004	0,82	0,485
NPI-F: ushićenje/euforija	0,239	1,02	0,309	0,014	1,70	0,171
NPI-G: apatija/ravnodušnost	0,371	0,65	0,519	0,040	3,06	0,030
NPI-H: dezinhibicija	-0,028	-0,09	0,925	-0,012	0,40	0,755
NPI-I: razdražljivost/labilnost	-0,123	-0,25	0,805	-0,016	0,22	0,881
NPI-J: aberantno motoričko ponašanje	0,800	1,76	0,080	0,006	1,28	0,283
NPI-K: poremećaji spavanja i noćni nemir	-0,967	-2,45	0,016	0,074	3,68	0,015
NPI-L: poremećaji prehrane i apetita	0,884	2,15	0,034	0,017	1,60	0,197

Svi modeli višestruke linearne regresije su korigirani za utjecaj spola i dobi.

NPI, neuropsihijatrijski inventar.

Kako bi dodatno ispitali povezanost simptoma poremećaja spavanja i noćnog nemira s haplotipom H3 svi su ispitanici podijeljeni prema broju bodova na domeni NPI-K na osobe s 0 (bez simptoma/poremećaja) i ispitanike s brojem bodova ≥ 1 (sa simptomima/poremećajem). Rezultat pokazuje da nema značajne razlike u raspodjeli nosioca haplotipa H3 i ostalih genotipova između skupina ispitanika podijeljenih prema broju bodova vezanih za domenu NPI-K ($\chi^2=2,16$; $df=1$; $p=0,142$).

Haplotip H4 (GGTTG) gena BDNF i skala neuropsihijatrijski inventar

U slučaju haplotipa H4, rezultati višestruke linearne regresije, koja uspoređuje ukupan broj bodova na skali NPI te broj bodova vezanih za pojedine domene skale između nosioca i ne-nosioca haplotipa H4, pokazuje da haplotip H4 nema značajan utjecaj na ozbiljnost simptoma koje evaluira NPI nakon korekcije za spol i dob (Tablica 49).

Tablica 49. Utjecaj haplotipa H4 gena za moždani neurotrofni čimbenik na broj bodova na neuropsihijatrijskom inventaru.

NPI	Nosioci haplotipa H4 (GGTTG)			Model višestruke linearne regresije		
	Koeficijent	t	p	Korigirani R ²	F	p
NPI-ukupno	-2,333	-1,15	0,251	0,028	3,21	0,024
NPI-A: deluzije	0,144	0,31	0,755	0,043	2,49	0,065
NPI-B: halucinacije	0,385	1,08	0,283	0,049	2,71	0,049
NPI-C: agitacija/agresija	-0,140	-0,34	0,737	0,002	1,06	0,369
NPI-D: depresija/disforija	-0,535	-0,88	0,378	-0,007	0,66	0,578
NPI-E: anksioznost	-0,990	-1,30	0,195	0,004	1,19	0,315
NPI-F: ushićenje/euforija	-0,157	-0,52	0,600	0,009	1,43	0,236
NPI-G: apatija/ravnodušnost	-0,412	-0,56	0,573	0,039	3,02	0,032
NPI-H: dezinhibicija	-0,550	-1,46	0,146	0,002	1,11	0,346
NPI-I: razdražljivost/labilnost	-1,009	-1,61	0,109	0,001	1,07	0,363
NPI-J: aberantno motoričko ponašanje	-0,750	-1,29	0,198	-0,004	0,80	0,495
NPI-K: poremećaji spavanja i noćni nemir	-0,149	-0,29	0,773	0,018	1,61	0,192
NPI-L: poremećaji prehrane i apetita	-0,260	-0,49	0,626	-0,027	0,13	0,943

Svi modeli višestruke linearne regresije su korigirani za utjecaj spola i dobi.

NPI, neuropsihijatrijski inventar.

Haplotip H5 (AGCCG) gena BDNF i skala neuropsihijatrijski inventar

Rezultati višestruke linearne regresije pokazuju da nema značajne razlike u ukupnom broju bodova na skali NPI te u broju bodova na pojedinim domenama skale između nosioca i ne-nosioca haplotipa H5, nakon korekcije za spol i dob (Tablica 50).

Tablica 50. Utjecaj haplotipa H5 gena za moždani neurotrofni čimbenik na broj bodova na neuropsihijatrijskom inventaru.

NPI	Nosioci haplotipa H5 (AGCCG)			Model višestruke linearne regresije		
	Koeficijent	t	p	Korigirani R ²	F	p
NPI-ukupno	-1,540	-0,61	0,541	0,024	2,88	0,037
NPI-A: deluzije	-0,611	-1,02	0,312	0,052	2,83	0,043
NPI-B: halucinacije	-0,385	-0,82	0,415	0,044	2,54	0,061
NPI-C: agitacija/agresija	0,484	0,89	0,376	0,009	1,29	0,281
NPI-D: depresija/disforija	-0,395	-0,50	0,615	-0,011	0,48	0,694
NPI-E: anksioznost	-0,378	-0,38	0,702	-0,007	0,67	0,571
NPI-F: ushićenje/euforija	-0,034	-0,09	0,931	0,007	1,34	0,263
NPI-G: apatija/ravnodušnost	1,258	1,34	0,181	0,049	3,55	0,016
NPI-H: dezinhibicija	-0,284	-0,58	0,562	-0,011	0,51	0,677
NPI-I: razdražljivost/labilnost	-0,463	-0,57	0,570	-0,014	0,31	0,818
NPI-J: aberantno motoričko ponašanje	-1,049	-1,40	0,162	-0,002	0,90	0,443
NPI-K: poremećaji spavanja i noćni nemir	0,358	0,53	0,597	0,020	1,68	0,177
NPI-L: poremećaji prehrane i apetita	0,035	0,05	0,961	0,002	0,05	0,985

Svi modeli višestruke linearne regresije su korigirani za utjecaj spola i dobi.

NPI, neuropsihijatrijski inventar.

Haplotip H6 (AGTCA) gena BDNF i skala neuropsihijatrijski inventar

U slučaju haplotipa H6, rezultati višestruke linearne regresije pokazuju da postoji značajna razlika u broju bodova vezanih za domenu NPI-G (apatija/ravnodušnost) između nosioca i ne-nosioca haplotipa H6 nakon korekcije za spol i dob (Tablica 51). Rezultat upućuje na to da je zadani model odgovoran za 6,5% varijacije koja je vidljiva u broju bodova na domeni NPI-G.

Tablica 51. Utjecaj haplotipa H6 gena za moždani neurotrofni čimbenik na broj bodova na neuropsihijatrijskom inventaru.

NPI	Nosioci haplotipa H6 (AGTCG)			Model višestruke linearne regresije		
	Koeficijent	t	p	Korigirani R ²	F	p
NPI-ukupno	-3,095	-0,94	0,350	0,026	3,05	0,029
NPI-A: deluzije	-0,873	-1,15	0,253	0,055	2,93	0,037
NPI-B: halucinacije	-0,272	-0,46	0,648	0,040	2,37	0,075
NPI-C: agitacija/agresija	-0,438	-0,64	0,527	0,005	1,16	0,329
NPI-D: depresija/disforija	0,780	0,62	0,534	-0,010	0,53	0,663
NPI-E: anksioznost	-0,834	-0,53	0,597	-0,006	0,72	0,544
NPI-F: ushićenje/euforija	-0,113	-0,18	0,855	0,007	1,35	0,260
NPI-G: apatija/ravnodušnost	3,068	2,07	0,040	0,065	4,42	0,005
NPI-H: dezinhibicija	-0,625	-0,80	0,424	-0,008	0,61	0,610
NPI-I: razdražljivost/labilnost	-0,990	-0,76	0,447	-0,012	0,40	0,756
NPI-J: aberantno motoričko ponašanje	-0,598	-0,50	0,619	-0,014	0,32	0,808
NPI-K: poremećaji spavanja i noćni nemir	-0,463	-0,54	0,588	0,020	1,68	0,176
NPI-L: poremećaji prehrane i apetita	-0,355	-0,40	0,689	-0,028	0,10	0,958

Svi modeli višestruke linearne regresije su korigirani za utjecaj spola i dobi.

NPI, neuropsihijatrijski inventar.

Kako bi dodatno ispitali povezanost simptoma apatije/ravnodušnosti s haplotipom H6 svi su ispitanici podijeljeni prema broju bodova na domeni NPI-G na osobe s 0 (bez simptoma/poremećaja) i ispitanike s brojem bodova ≥ 1 (sa simptomima/poremećajem). Rezultat pokazuje da postoji značajna razlike u raspodjeli nosioca haplotipa H6 i ostalih genotipova između skupina ispitanika podijeljenih prema broju bodova na domeni NPI-G ($\chi^2=4,96$; $df=1$; $p=0,026$).

4.4.3.2. Haplotipovi gena za moždani neurotrofni čimbenik i skala za procjenu bihevioralne patologije u Alzheimerovoj bolesti

Rezultati višestruke linearne regresije pokazuju da ne postoji značajna razlika u broju bodova na skali BEHAVE-AD između nosioca i ne-nosioca određenih haplotipova nakon korekcije za spol i dob (Tablica 52).

Tablica 52. Utjecaj haplotipova gena za moždani neurotrofni čimbenik na broj bodova na skali za procjenu bihevioralne patologije u Alzheimerovoj bolesti.

Haplotip	Nosioci haplotipa			Model višestruke linearne regresije		
	Koeficijent	t	p	Korigirani R ²	F	p
H1 (AGTCA)	6,152	1,21	0,232	0,045	1,71	0,180
H2 (AACCG)	-3,570	-0,93	0,358	0,031	1,48	0,232
H3 (GGTCG)	-5,292	-1,21	0,233	0,045	1,70	0,181
H4 (GGTTG)	7,488	1,42	0,164	0,056	1,90	0,145
H5 (AGCCG)	2,752	0,43	0,672	0,016	1,24	0,308
H6 (AGTCG)	-8,643	-1,17	0,250	0,042	1,66	0,189

Svi modeli višestruke linearne regresije su korigirani za utjecaj spola i dobi.

4.5. Polimorfizmi gena za moždani neurotrofni čimbenik te tropomiozin-receptor-kinazu B i koncentracija moždanog neurotrofnog čimbenika u plazmi

Utjecaj istraživanih polimorfizama gena BDNF i TrkB na koncentraciju BDNF-a u plazmi oboljelih od demencije ili MCI-a analiziran je metodom dvosmjerne ANOVA-e koja procjenjuje odnos između jedne kontinuirane varijable (koncentracija proteina BDNF u plazmi) i dvije nominalne varijable (dijagnoza i pojedini polimorfizam). Zbog odstupanja od normalne razdiobe podataka u analizama su korištene transformirane vrijednosti koncentracije BDNF-a u plazmi.

Rezultati dvosmjerne ANOVA-e potvrdili su značajan utjecaj dijagnoze, ali ne i značajan učinak istraživanih polimorfizama i haplotipova, zasebno i u kombinaciji s dijagnozom, na vrijednosti koncentracije BDNF-a u plazmi (Tablica 53).

Tablica 53. Utjecaj polimorfizama i kombiniranih haplotipova gena za moždani neurotrofni čimbenik te polimorfizma gena za tropomiozin-receptor-kinazu B na koncentraciju proteina BDNF u plazmi.

Utjecaj varijabli na koncentraciju BDNF-a u plazmi (dvosmjerna ANOVA)									
SNP/Haplotip	Dijagnoza			SNP/Haplotip			Dijagnoza x SNP/Haplotip		
	F	df	p	F	df	p	F	df	p
rs1519480	7,22	2	0,001	0,44	1	0,507	0,52	2	0,594
rs6265	7,98	2	<0,001	0,21	1	0,651	1,41	2	0,247
rs11030104	7,39	2	0,001	0,01	1	0,912	0,70	2	0,496
rs56164415	0,67	2	0,512	1,46	1	0,228	1,98	2	0,141
rs7934165	7,07	2	0,001	0,79	2	0,454	0,85	4	0,495
rs1439050	7,39	2	0,001	0,44	2	0,641	1,55	4	0,189
H1 (AGTCA)	5,75	2	0,004	1,22	1	0,270	0,86	2	0,424
H2 (AACCG)	7,98	2	<0,001	0,21	1	0,651	1,41	2	0,247
H3 (GGTCG)	6,42	2	0,002	1,82	1	0,178	0,02	2	0,984
H4 (GGTTG)	0,44	2	0,646	1,61	1	0,206	2,56	2	0,079
H5 (AGCCG)	2,43	2	0,089	0,04	1	0,839	0,17	2	0,840
H6 (AGTCG)	0,25	2	0,777	0,17	1	0,683	1,27	2	0,283

ANOVA, analiza varijance; BDNF, moždani neurotrofni čimbenik; SNP, polimorfizam jedne baze.

4.6. Ekspresija gena za moždani neurotrofni čimbenik i sortirajući receptor prekursora peptida amiloid- β

Metodom PCR-a u stvarnom vremenu određena je razlika u ekspresiji gena BDNF i gena SORL1, na razini mRNA, između pacijenata s dijagnozom AB-a i onih koji imaju dijagnozu MCI-a. Kako bi se izbjegla pogreška u određivanju ekspresije gena zbog razlike u kvaliteti uzoraka, istovremeno uz određivanje Ct vrijednosti (ciklus u kojem fluorescentni signal ispitivanog gena prijeđe prag detekcije) specifične za gen BDNF i gen SORL1, određena je i Ct vrijednost koja je specifična za kontrolni gen β -aktin (ACTB). Gen ACTB predložen je kao optimalna kontrola jer pokazuje konstantni nivo ekspresije u ljudskim leukocitima (Spinsanti i sur., 2008). Ekspresija oba analizirana gena normalizirana je s obzirom na ekspresiju endogene kontrole, tj. gena ACTB.

Za određivanje relativne mRNA ekspresije korištena je komparativna Ct metoda, $\Delta\Delta Ct$, (Livak i Schmittgen, 2001), gdje Ct (engl. *threshold cycle*) označava ciklus pri kojem količina umnoženog produkta dosegne određeni prag detekcije fluorescentnog signala. Razlika u Ct vrijednosti za svaki ciljani gen, normalizirana za ekspresiju gena ACTB, izražena je kao ΔCt vrijednost. Razlika u transkripcijskoj ekspresiji ciljnih gena kod ispitanika s AB-om izražena je kao relativna ekspresija (engl. *fold change*) u odnosu na ekspresiju kod ispitanika s dijagnozom MCI-a (kontrolni uzorak). Relativna razlika u ekspresiji gena određena je prema Formuli (2).

$$\begin{aligned}\Delta Ct_{AB} &= Ct_{\text{ciljni gen, AB}} - Ct_{\text{ACTB, AB}} \\ \Delta Ct_{MCI} &= Ct_{\text{ciljni gen, MCI}} - Ct_{\text{ACTB, MCI}} \\ \Delta\Delta Ct &= \Delta Ct_{AB} - \Delta Ct_{MCI} \\ \text{Normalizirana ekspresija ciljnog gena} &= 2^{-\Delta\Delta Ct}\end{aligned}$$

Ct = ciklus u kojem fluorescentni signal ispitivanog gena prijeđe prag detekcije

(2)

Ekspresija gena BDNF i SORL1 analizirana je na manjem uzorku od ukupno 22 ispitanika (12 ispitanika s AB-om i 10 ispitanika s MCI-em). Normalna razdioba vrijednosti ekspresije analiziranih gena testirana je Kolmogorov-Smirnovim testom. S obzirom da nije bilo odstupanja od normalne razdiobe podataka, u svim analizama korišteni su parametrijski testovi za statističku obradu podataka.

Rezultati usporedbe ekspresije gena BDNF i SORL1 između pacijenata s dijagnozom AB-a i ispitanika kojima je dijagnosticiran MCI upućuju na to da nema razlike između istraživanih skupina s obzirom na ekspresiju navedenih gena (Tablica 54). U slučaju gena BDNF vidljiv je određeni trend ($p=0,062$) smanjene ekspresije gena BDNF kod osoba s dijagnozom AB-a u odnosu na skupinu s dijagnozom MCI-a (Tablica 54). Relativna ekspresija mRNA gena BDNF u odnosu na gen ACTB smanjena je oko 3 puta ($2^{-\Delta\Delta Ct}=0,33$) kod pacijenata s dijagnozom AB-a u odnosu na ispitanike kojima je dijagnosticiran

MCI. U slučaju gena SORL1 razlike u relativnoj ekspresiji nema ($2^{-\Delta\Delta Ct}=1,05$) između istraživanih skupina.

Tablica 54. Ekspresija gena za moždani neurotrofni čimbenik i gena za sortirajući receptor prekursora proteina amiloid- β u mononuklearnim stanicama periferne krvi kod oboljelih od Alzheimerove bolesti ili blagog kognitivnog (spoznajnog) poremećaja.

Svi podaci su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija.

Gen	Ekspresija gena		t-test (df=20)		Relativna ekspresija gena	
	ΔCt_{AB}	ΔCt_{MCI}	t	p	$\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
BDNF	8,44 \pm 1,72	6,83 \pm 2,09	1,98	0,062	1,61	0,33
SORL1	3,82 \pm 0,77	3,89 \pm 0,82	-0,22	0,831	-0,07	1,05

AB, Alzheimerova bolest; BDNF, moždani neurotrofni čimbenika; SORL1, gen za sortirajući receptor prekursora proteina amiloid- β ; MCI, blagi kognitivni (spoznajni) poremećaj; ΔCt , ekspresija ciljnih gena; $2^{-\Delta\Delta Ct}$, relativna ekspresija gena.

5. RASPRAVA

U ovoj studiji istražena je uloga koncentracije proteina BDNF u plazmi u razvoju demencije i u razvoju kognitivnih simptoma i BPSD-a. Također, istraživana je i uloga pet polimorfizama gena BDNF (rs6264, rs11030104, rs7934165, rs1519480, rs56164415) i uloga jednog polimorfizma gena TrkB (rs1439050) u razvoju demencije te kognitivnih simptoma demencije i BPSD-a. Budući da je demencija složena bolest, na čiji nastanak i pojedine simptome može utjecati veliki broj čimbenika, veća je vjerojatnost da će određeni istraživani geni i njihovi polimorfizmi utjecati na razvoj specifičnih fenotipova, odnosno simptoma, koji prate i zajedno doprinose potpunoj slici bolesti, nego izravno na bolest kao jedinstvenu cjelinu. U istraživanju se pokušalo odgovoriti i na pitanje postoji li razlika u ekspresiji gena BDNF i gena SORL1, na razini mRNA, između pacijenata kojima je dijagnosticiran AB i onih koji imaju dijagnozu MCI-a.

Zbog porasta udjela starijih osoba u populaciji, broj oboljelih od demencije stalno se povećava te polako poprima karakteristike epidemije i postaje sve važniji javno-zdravstveni problem. Upravo iz ovog razloga vrlo je važno uspostaviti konkretne kriterije za donošenje što ranije i što pouzdanije dijagnoze bolesti te kriterije koji će omogućiti bolje razlikovanje između različitih tipova demencija. Želja kliničara i istraživača je uspostavljanje navedenih kriterija te kombinacije biomarkera i kliničkih metoda koje bi omogućile bolje razlikovanje između simptoma normalnog starenja, simptoma MCI-a i simptoma demencije. Pacijenti s dijagnozom MCI-a su idealna ciljna skupina u epidemiološkim, kliničkim i terapijskim studijama jer upravo veliki dio ovih pacijenata s vremenom razvije simptome demencije. Demenciju često prate i nekognitivni simptomi. U prisustvu BPSD-a dolazi do puno bržeg narušavanja kognitivnih sposobnosti kod pojedinaca te puno većih problema u obavljanju svakodnevnih obaveza. Ovo istraživanje daje bolji uvid u ulogu BDNF-a u demenciji, točnije u razvoju kognitivnih te bihevioralnih i psiholoških simptoma demencije.

Zna se da patološki proces vezan uz AB počinje najvjerojatnije desetljećima prije samog kliničkog početka bolesti. Za sada se sigurna dijagnoza AB-a može postaviti samo kombiniranim korištenjem kliničke dijagnoze i histopatološke analize moždanog tkiva nakon smrti pojedinca. Klinička dijagnoza AB-a temelji se na korištenju medicinskih podataka, neurološkim pregledima, laboratorijskim testovima, neuroslikovnim analizama te neuropsihološkoj evaluaciji. Liječenje same bolesti bi zasigurno bilo djelotvornije kada bi se terapiji pristupilo prije pojave prvih ozbiljnijih simptoma demencije. Upravo iz ovog razloga, ovo istraživanje u svom fokusu ima potragu za pouzdanim biokemijskim i genetičkim markerima koji bi mogli omogućiti pouzdanije i ranije razlikovanje između AB-a i MCI-a te ostalih tipova demencije (Humpel, 2011; Humpel i Hochstrasser, 2011).

5.1. Demografski podaci

U istraživanje je uključeno ukupno 318 ispitanika oba spola (47,1% muškaraca). Između istraživanih skupina ispitanika nije bilo razlike u raspodjeli prema spolu jer su u svim skupinama skoro podjednako zastupljeni muškarci i žene.

Tijekom planiranja istraživanja, zaključeno je da bi, za statističku potvrdu razlike između istraživanih skupina u koncentraciji proteina BDNF u plazmi, u studiju trebalo uključiti ukupno 246 ispitanika, dok bi u slučaju usporedbe koje se odnose na distribuciju genotipova analiziranih polimorfizama gena BDNF i TrkB dovoljan bio uzorak od 241 ispitanika. Prema ovim a priori analizama snage uzorka, tj. potrebne veličine uzorka, možemo zaključiti da je naš uzorak od ukupno 318 ispitanika dovoljan da procijenimo mjeru glavnog ishoda sa zadanom preciznošću.

Usporedba ispitanika podijeljenih s obzirom na dijagnozu u skupine ispitanika s dijagnozom MCI-a, AB-a, DLB-a, FTD-a i VaD-a pokazala je da se skupine značajno razlikuju prema starosti ispitanika jer su, kao što je i očekivano, ispitanici s dijagnozom AB-a bili najstariji, posebice u odnosu na skupinu s dijagnozom MCI-a i FTD-a. MCI često prethodi AB-u pa je bilo i za očekivati da su pacijenti s MCI-em mlađi od onih s dijagnozom demencije. FTD je oblik demencije koji je puno rjeđi od AB-a, ali je najčešći oblik demencije kod osoba mlađih od 65 godina što objašnjava razliku u godinama između istraživanih skupina (Walker i sur., 2005).

Pronađena je i razlika u broju bodova na psihometrijskim testovima koji su korišteni za procjenu kognitivnih simptoma (MMSE, CDT i ADAS-Cog) jer su u svim slučajevima pacijenti s MCI-em imali slabije kognitivno oštećenje u odnosu na ispitanike s različitim tipovima demencije. Potvrđena je i značajna razlika u broju bodova na skali NPI između skupina, a ispitanici s MCI-em i dijagnozom VaD-a imali su najmanji zbroj bodova na navedenoj skali. Međutim, treba uzeti u obzir da, u pravilu, ispitanici s MCI-em nisu ni imali BPSD pa je dobiveni rezultat u skladu s očekivanjima. Ispitanika s dijagnozom VaD-a bilo je premalo (N=16) da bi mogli biti sigurni u dobiveni rezultat. Upravo iz ovog razloga su u kasnijim analizama svi ispitanici s dijagnozom demencije, koja nije AB, svrstani u zajedničku skupinu demencija drugog tipa. Između istraživanih skupina pronađena je i značajna razlika s obzirom na raspodjelu prema skali CDR. Svi dobiveni rezultati potvrdili su da osobe s dijagnozom MCI-a imaju slabije kognitivno oštećenje te manje nekognitivnih simptoma u odnosu na ispitanike kojima je dijagnosticirana demencija.

Stupanj obrazovanja, tj. duljina trajanja obrazovanja, često se uzima u obzir kod istraživanja demencija (Sharp i Gatz, 2011). U ovom istraživanju pronađena je razlika između skupina u stupnju obrazovanja, ali ta razlika nije bila značajna kada su naknadno, post-hoc testom, uspoređene sve skupine međusobno.

5.2. Koncentracija moždanog neurotrofnog čimbenika u plazmi

Biomarkeri su indikatori normalnih bioloških procesa, patoloških procesa ili terapijske intervencije koji se mogu objektivno kvantificirati i evaluirati. Glavne karakteristike biomarkera su osjetljivost, specifičnost te jednostavnost određivanja i korištenja u navedene svrhe. Potraga za perifernim markerima za AB temelji se na ideji da se promjene u prijenosu signala, oksidativnom metabolizmu i metabolizmu APP-a, koje su vidljive u SŽS-u, mogu detektirati i u perifernom tkivu (Gasparini i sur., 1998). Periferna tkiva predstavljaju jednostavniji i lakše dostupan model za proučavanje patogeneze AB-a, a do sada su se kao periferni modeli istraživali trombociti, fibroblasti te mononuklearne stanice periferne krvi (Mossello i sur., 2011). Jedan od glavnih izvora BDNF-a na periferiji su trombociti koji vežu, pohranjuju i, prema potrebi, otpuštaju BDNF (Fujimura i sur., 2002). Navedena uloga trombocita je ključna u slučajevima kada dolazi do određenih oštećenja organizma (Fujimura i sur., 2002). Poznato je da na razinu proteina BDNF u serumu utječe količina BDNF-a koja je pohranjena u trombocitima, dok razina BDNF-a u plazmi predstavlja trenutačno stanje organizma i količinu dostupnog bioaktivnog proteina (Fujimura i sur., 2002). Smatra se da je iz navedenih razloga koncentracija proteina BDNF u plazmi objektivniji pokazatelj stanja u organizmu u odnosu na koncentraciju u serumu (Fujimura i sur., 2002). Istraživanje na uzorcima krvi i tkivu štakora (Elfving i sur., 2010) pokazala su da pri korištenju uzoraka plazme treba obratiti pozornost na to da su uzorci plazme osjetljiviji na temperaturu i stajanje. Upravo iz ovog razloga uzorci korišteni za ovo istraživanje obrađeni su unutar par sati od uzorkovanja, a u međuvremenu su bili pohranjeni na 4°C.

Najveći problem određivanja koncentracije proteina BDNF na periferiji pomoću metode ELISA je nespecifičnost korištenih protutijela na proBDNF, odnosno mBDNF. Problem predstavljaju i različiti rezultati u slučajevima analize seruma, plazme i pune krvi (Karege i sur., 2002). U slučaju komercijalno dostupnog ELISA kompleta tvrtke R&D Systems, Inc. (SAD i Kanada), koji je korišten za analizu koncentracije BDNF-a u sklopu ovog istraživanja, pokazano je da spomenuti komplet vrlo uspješno detektira mBDNF u plazmi, ali ne i proBDNF (Yoshida i sur., 2012). Podaci proizvođača i podaci iz literature pokazuju da je varijacija/preciznost rezultata unutar istog kompleta (engl. *intra-assay*) od 3,8 do 6,2%, a između dva kompleta od 7,6 do 11,3% (engl. *inter-assay*) (Elfving i sur., 2010). Glavna ideja današnje potrage za perifernim biomarkerima u dijagnozi demencije je pronalazak jeftinije dijagnostičke metode, kao što je npr. višestruki ELISA sustav, kojim bi se u isto vrijeme iz jednog uzorka moglo određivati više biokemijskih parametara.

Prema podacima iz literature postoje naznake da bi pri određivanju koncentracije BDNF-a na periferiji u obzir trebalo uzeti dob, spol te duljinu obrazovanja za sve ispitanike. Istraživanja predlažu da bi koncentracija BDNF-a u plazmi mogla biti pod utjecajem dobi, točnije da se razina ovog neurotrofina smanjuje kako organizam stari (Lommatzsch i sur., 2005; Pillai i sur., 2012). Postoje studije koje su pokazale da nema utjecaja dobi na koncentraciju proteina BDNF u serumu (Angelucci i sur., 2010; Gunstad i sur., 2008; Laske i sur., 2007; Lommatzsch i sur., 2005; Nettiksimmons i sur., 2014; Trajkovska i sur., 2007; Yasutake i sur., 2006), ali postoje i istraživanja koja su dala suprotne rezultate (Erickson i sur., 2010; Lang i sur., 2004; Ziegenhorn i sur., 2007).

U slučajevima gdje su primijećene razlike između muškaraca i žena u razini ovog neurotrofina na periferiji, smatra se da su te promjene povezane s izlučivanjem estrogena (Komulainen i sur., 2008; Lommatzsch i sur., 2005; Trajkovska i sur., 2007). Estrogeni bi mogli sudjelovati u regulaciji ekspresije BDNF-a, a postoje i preklapanja u djelovanju ovih dvaju molekula (Scharfman i MacLusky, 2006; Sohrabji i Lewis, 2006).

Modeli višestruke linearne regresije, u kojima su analizirani utjecaj dobi, spola te duljine trajanja obrazovanja na koncentraciju proteina BDNF u plazmi, za sve ispitanike zajedno i za sve dijagnostičke skupine zasebno, nisu bili značajni zbog čega analizirane varijable nisu u pravilu uključene u daljnje analize. Ovaj rezultat vjerojatno je posljedica činjenice da se dob većine ispitanika uključenih u istraživanje nalazi u rasponu od 66 do 80 godina (prosječna dob je $72,7 \pm 10,7$ godina), što je uži raspon godina u odnosu na većinu studija koje su potvrdile negativnu korelaciju perifernog BDNF-a i dobi (Lommatzsch i sur., 2005; Pillai i sur., 2012). Pretpostavka je da u kasnijoj životnoj dobi koncentracija BDNF-a manje varira, a kod žena je u toj dobi izgubljen i utjecaj estrogena na razinu ovog neurotrofina.

Istraživanja su dokazala da BDNF može prijeći krvno-moždanu barijeru (Pan i sur., 1998a; Pan i sur., 1998b; Poduslo i Curran, 1996), a potvrđena je i pozitivna korelacija između razine BDNF-a u serumu i kortikalnim regijama kod životinja (Karege i sur., 2002). Sve navedeno upućuje na činjenicu da bi mogla postojati povezanost između promjena u koncentraciji BDNF-a u SŽS-u i na periferiji. U ovom istraživanju korištena je koncentracija BDNF-a u plazmi, a ne u serumu kako bi se izbjegao mogući utjecaj proteina BDNF kojeg otpuštaju trombociti (Fujimura i sur., 2002) i stanice imunološkog sustava (Kerschensteiner i sur., 1999) na dobivene rezultate. Neki autori čak navode da bi povišena koncentracija BDNF-a u serumu mogla biti povezana s upalnim procesom koji je vidljiv kod pacijenata s AB-om (Angelucci i sur., 2010).

5.2.1. Koncentracija moždanog neurotrofnog čimbenika u plazmi ispitanika oboljelih od demencije ili blagog kognitivnog (spoznajnog) poremećaja

Dosadašnje analize koncentracije proteina BDNF u serumu i plazmi, vezano za razvoj demencije, dale su oprečne rezultate. Neka istraživanja pokazala su smanjenu koncentraciju ovog proteina u serumu osoba oboljelih od AB-a (Laske i sur., 2007; Yasutake i sur., 2006) i osoba s dijagnozom MCI-a (Yu i sur., 2008) u odnosu na zdravu kontrolu i druge oblike demencije. Istraživanje koje su proveli Yasutake i suradnici (2006) potvrdilo je postojanje smanjene koncentracije BDNF-a u serumu osoba kod kojih je bolest već uznapredovala. Laske je sa suradnicima (2006) pokazao da je koncentracija ovog neurotrofina u serumu različita ovisno o stadiju bolesti, tj. da osobe u ranoj fazi AB-a imaju više proteina BDNF u serumu od osoba u kasnijim fazama bolesti te zdravih osoba. Ovi rezultati potvrđeni su istraživanjem koje je proveo Angelucci sa svojim suradnicima (2010).

Smatra se da bi povećanje razine proteina BDNF u ranim fazama razvoja AB-a moglo biti posljedica kompenzacijskog mehanizma kojim se pokušava poboljšati razgradnja peptida A β ili posljedica

nakupljanja ovog neurotrofina zbog neefikasnog transporta u aksonima (Angelucci i sur., 2010). U skladu s ovim rezultatima su i rezultati post-mortem istraživanja na osobama oboljelima od AB-a koje je proveo Durany sa suradnicima (2000), a koje je pokazalo da postoji značajno viša koncentracija BDNF-a u hipokampusu i parijetalnom korteksu ovih ispitanika. Usporedba kontrolnih ispitanika i osoba s različitim tipovima demencije (AB, DLB, FTD i VaD) potvrdila je sniženu koncentraciju BDNF-a u serumu svih ispitanika s dijagnozom demencije u odnosu na kontrole, osim u slučaju dijagnoze PB-a (Ventriglia i sur., 2013).

Rezultati ovog rada upućuju na povećanu koncentraciju proteina BDNF u plazmi osoba s dijagnozom AB-a u odnosu na skupinu pacijenata kojima je dijagnosticiran MCI i u odnosu na pacijente s dijagnozom FTD-a. Kada su svi ispitanici kojima su dijagnosticirani drugi oblici demencije (DLB, FTD ili VaD) uspoređeni, kao jedinstvena skupina, s ispitanicima kojima je dijagnosticiran AB, također je uočena povećana koncentracija proteina BDNF kod ispitanika s AB-om u odnosu na ispitanike unutar skupine s demencijama drugog tipa.

Za razliku od većine dosadašnjih istraživanja, koja su najviše usmjerena na usporedbu koncentracije BDNF-a između zdravih ispitanika i osoba s demencijom, ovo istraživanje proučava razliku u koncentraciji BDNF-a u plazmi osoba s MCI-em (kojeg možemo promatrati kao pretstadij demencije) i osoba kod kojih je već došlo do razvoja bolesti. Ideja istraživanja je potvrditi hipotezu da se koncentracija BDNF-a može koristiti kao marker za praćenje progresije bolesti. Podaci iz literature su oprečni, što je vjerojatno posljedica različitog udjela pacijenata u različitim fazama demencije u pojedinim studijama.

Prema dosadašnjim saznanjima o ulozi BDNF-a u razvoju demencije moglo bi se zaključiti da u ranoj fazi MCI-a, koji predstavlja prijelazno stanje između normalnog starenja i demencije, dolazi do smanjenja koncentracije BDNF-a u odnosu na zdrave ispitanike. Ispitanici s dijagnozom MCI-a u ovom radu imali su prosječan broj bodova na testu MMSE $25,5 \pm 2,1$ (raspon 21 do 30), tako da su u ovu skupinu ispitanika uključene osobe s normalnim kognitivnim sposobnostima (27,6% ispitanika) i osobe kod kojih je vidljivo blago kognitivno oštećenje (72,3% ispitanika). S obzirom na veći udio osoba s blagim kognitivnim oštećenjem u skupini ispitanika s dijagnozom MCI-a možemo pretpostaviti da se kod ove skupine ispitanika još ne javlja kompenzacijski mehanizam kao odgovor na smanjenu koncentraciju BDNF-a pa bi razina BDNF-a mogla biti smanjena u odnosu na ispitanike s normalnim kognitivnim sposobnostima. Nije pronađena značajna razlika u koncentraciji BDNF-a u plazmi kod ispitanika u ranoj fazi AB-a u odnosu na osobe s dijagnozom MCI-a, ali je vidljiv trend povećanja koncentracije ovog neurotrofina kod osoba s dijagnozom demencije. Razlika postaje značajna kod skupine u srednjoj fazi demencije kada se predloženi kompenzacijski mehanizam aktivira. U kasnoj fazi demencije propadanje neurona je uznapredovalo tako da očekivano dolazi do ponovnog pada u koncentraciji BDNF-a u plazmi u odnosu na osobe u srednjoj fazi demencije, tj. razina BDNF-a u plazmi se ponovo vraća na razinu sličnu onoj kod pacijenata s dijagnozom MCI-a.

Dobiveni rezultati su u skladu sa zaključcima koje je dao Angelucci sa suradnicima (2010) i upućuju na to da bi sistemsko povećanje razine BDNF-a moglo predstavljati kompenzacijski mehanizam kojim

se organizam pokušava obraniti od potencijalnog oštećenja. Među ispitanicima uključenima u istraživanje s dijagnozom AB-a bilo je više pacijenata u ranoj (34,4% ispitanika) i srednjoj fazi (57,8%) demencije (srednja vrijednost bodova na testu MMSE je $17,7 \pm 5,6$). U ovim fazama bolesti organizam još uvijek pokušava kompenzirati oštećenje koje nastaje propadanjem neurona. Kod pacijenta u kasnoj fazi bolesti (7,8% ispitanika) kompenzacija više nije dovoljna da prevlada oštećenje (broj MMSE bodova <10) jer je neurodegeneracija već uznapredovala. Rezultati odgovaraju zaključku kojeg su iznijeli Laske i suradnici (2006) i pretpostavci da povećana koncentracija BDNF-a ne mora uvijek biti marker dobrog stanja, već može upućivati na ozbiljnije poremećaje ravnoteže organizma (Arentoft i sur., 2009). Niža koncentracija proteina BDNF, koja je zamijećena kod pacijenata s drugim tipovima demencija u odnosu na ispitanike s dijagnozom AB-a (posebice u odnosu na one u srednjoj fazi AB-a), u skladu je s rezultatima istraživanja koje su proveli Ventriglia i suradnici (2013), a koje upućuje na smanjenu razinu proteina BDNF u serumu osoba s dijagnozom VaD-a, DLB-a i FTD-a.

5.2.2. Koncentracija moždanog neurotrofnog čimbenika u plazmi i kognitivni simptomi demencije

Malobrojna istraživanja o ulozi proteina BDNF u razvoju kognitivnih simptoma demencije dala su konfliktne rezultate (Driscoll i sur., 2012; Laske i sur., 2011; Li i sur., 2009; Nettiksimmons i sur., 2014). Dio studija pokazuje da se smanjenje u koncentraciji BDNF-a u CST-u može povezati s propadanjem kognitivnih funkcija kod zdravih ispitanika (Li i sur., 2009). U slučaju koncentracije BDNF-a u serumu, postoje studije koje potvrđuju povezanost BDNF-a i boljeg kognitivnog funkcioniranja kod zdravih ispitanika (Gunstad i sur., 2008), ali druge studije nisu potvrdile ovaj rezultat (Nettiksimmons i sur., 2014). Istraživanje koje je proveo Shimada sa suradnicima (2014) upućuje na povezanost niže koncentracije BDNF-a u serumu i dijagnoze MCI-a te lošijih kognitivnih sposobnosti kod starijih osoba. U slučaju BDNF-a u plazmi, postoje istraživanja koje ne potvrđuju ulogu ovog neurotrofina u razvoju kognitivnih simptoma (Driscoll i sur., 2012) i ona koja upućuju na povezanost između kognitivnog funkcioniranja i proteina BDNF kod ispitanica nakon korekcije za djelovanje više kofaktora (Komulainen i sur., 2008).

Za razliku od većine dosadašnjih istraživanja, ovo istraživanje u obzir uzima mnogobrojne potencijalne kofaktore koji mogu utjecati na koncentraciju proteina BDNF u plazmi (dob, spol, obrazovanje, kognitivne i nekognitivne simptome demencije, izabrane polimorfizme gena BDNF i TrkB) te eliminira mogući utjecaj broja trombocita i rasne pripadnosti na dobivene rezultate (uzorak je homogen jer su svi ispitanici bili bijelci hrvatskog podrijetla). U ispitivanim skupinama nije bilo niti utjecaja alela E4 gena ApoE na koncentraciju proteina BDNF u plazmi (rezultati nisu prikazani).

Većina studija za procjenu kognitivnog oštećenja kod ispitanika koristi samo test MMSE, a ovaj rad analizira više psihometrijskih skala koje se koriste za procjenjivanje kognitivnog oštećenja. Rezultati istraživanja pokazali su da nema značajne korelacije broja bodova na testu MMSE i koncentracije

proteina BDNF u plazmi, ali je ipak vidljiv određeni trend povezanosti ovih dvaju varijabli kada se promatraju svi ispitanici zajedno i kada se promatra zasebno skupina ispitanika s dijagnozom AB-a. Kako bi dodatno provjerili da li je ovaj trend indikativan, napravljena je usporedba skupine ispitanika s AB-om sa skupinama ispitanika s dijagnozom MCI-a ili drugih oblika demencije. Ispitanici s AB-om su prije usporedbe podijeljeni prema broju MMSE bodova na ispitanike u ranoj, srednjoj i kasnoj fazi demencije. Kao što je već navedeno, usporedba je potvrdila očekivanu razliku među istraživanim skupinama. Ovaj rezultat posljedica je značajno više koncentracije proteina BDNF u plazmi ispitanika u srednjoj fazi AB-a u odnosu na druge ispitivane skupine. Kod ispitanika s MCI-em i ispitanika s dijagnozom demencija drugog tipa, koncentracija BDNF-a bila je značajno niža u odnosu na pacijente u srednjoj fazi AB-a. Isto je potvrđeno kada su analizirane transformirane vrijednosti koncentracije BDNF-a u plazmi. Dobiveni rezultat je u skladu s nekim dosadašnjim istraživanjima (Angelucci i sur., 2010; Laske i sur., 2006), a najvjerojatnije je posljedica pokušaja organizma da kompenzira negativan učinak bolesti na propadanje neurona u SŽS-u.

Test CDT također se često koristi za procjenu kognitivnog oštećenja kod pacijenata s dijagnozom demencije. Svaki od psihometrijskih testova koji se koriste u obradi pacijenata s demencijom ima svoja ograničenja. Postoje naznake da je test CDT precizan samo u slučajevima pacijenata u srednjoj i kasnoj fazi demencije (Nishiwaki i sur., 2004) te u populacijama u kojima nema puno osoba s vrlo niskim stupnjem obrazovanja (Ainslie i Murden, 1993). Postoje prijedlozi za korištenje kombinacije različitih psihometrijskih testova kako bi se povećala uspješnost detekcije osoba u vrlo ranoj fazi demencije te osoba s MCI-em (Arahamian i sur., 2010; Cacho i sur., 2010). Rezultati ovog istraživanja upućuju na pozitivnu korelaciju između koncentracije proteina BDNF i broja bodova na testu CDT kod skupine ispitanika s dijagnozom demencija drugog tipa. Povezanost razine kognitivnog oštećenja, procijenjenog pomoću testa CDT, s koncentracijom proteina BDNF u skupini demencija drugog tipa, potvrđena je i nakon što su istraživane skupine podijeljene na ispitanike s većim kognitivnim oštećenjem ($CDT \leq 5$) i slabijim kognitivnim oštećenjem ($CDT > 5$). Za dodatnu potvrdu napravljena je i analiza transformiranih vrijednosti koncentracije BDNF-a u plazmi. Značajan rezultat posljedica je veće koncentracije proteina BDNF u plazmi ispitanika s dijagnozom demencija drugog tipa, kod kojih je vidljivo slabije kognitivno oštećenje, što odgovara podacima iz literature koji navode smanjenje koncentracije neurotrofina BDNF kao posljedicu neurodegeneracije. U slučaju ispitanika s AB-om rezultat nije značajan što dovodi do zaključak da test CDT slabije reflektira progresiju bolesti u odnosu na test MMSE kod ovih bolesnika. Može se reći da je podjela prema broju MMSE bodova puno osjetljivija u odnosu na podjelu prema CDT bodovima u slučaju AB-a. Problem u dijagnozi demencije je i razlikovanje između različitih tipova demencije. Sigurna dijagnoza može se postaviti samo post-mortem analizama. Među ispitanicima koji su kombinirani u skupinu demencija drugog tipa najzastupljeniji su ispitanici s dijagnozom FTD-a. Za razliku od AB-a, FTD u ranim fazama bolesti ne karakterizira značajno oštećenje kognitivnih sposobnosti. Do danas nije pronađen niti jedan psihometrijski test koji bi omogućio pouzdano razlikovanje između različitih oblika demencije (Hutchinson i Mathias, 2007).

Podskala ADAS-Cog analizira 11 različitih stavki koje mjere poremećaje pamćenja, govora, pažnje te ostalih kognitivnih funkcija, a često se koristi za procjenu kognitivnih sposobnosti osoba u kliničkim ispitivanjima. Ovo istraživanje nije potvrdilo povezanost bodova na podskali ADAS-Cog i koncentracije proteina BDNF u plazmi svih istraživanih skupina. Razlike među skupinama nije bilo ni nakon podjele ispitanika na kategorije prema broju ADAS-Cog bodova na ispitanike sa značajnijim kognitivnim oštećenjem ($ADAS \geq 18$) i one s manjim kognitivnim oštećenjem ($ADAS < 18$).

Skala CDR koristi se za rangiranje demencije prema stupnju ozbiljnosti bolesti u 4 kategorije (vrlo blagi, blagi, umjereni i teški oblik demencije). Rang CDR-0 označava da nema kognitivnog oštećenja. Rezultati ovog istraživanja nisu potvrdili povezanost koncentracije BDNF-a u plazmi s razinom kognitivnog oštećenja procijenjenog skalom CDR u svim istraživanim skupinama. Ipak iz rezultata je vidljiv trend povećane koncentracije BDNF-a kod ispitanika s težim oblikom AB-a (kategorija CDR-2 i CDR-3) te obrnuti trend kod ispitanika s dijagnozom demencija drugog tipa. Rezultat nije značajan, ali je u skladu s rezultatima dobivenima za ostale psihometrijske skale.

Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da nema značajne korelacije broja bodova na testu MMSE i koncentracije proteina BDNF u plazmi, ali je detektirana značajno viša koncentracija proteina BDNF u plazmi ispitanika u srednjoj fazi u odnosu na bolesnike u ranoj i kasnoj fazi AB-a te u odnosu na ispitanike s MCI-em i ispitanike s dijagnozom demencija drugog tipa. Također, pronađena je pozitivna korelacija između koncentracije proteina BDNF i broja bodova na testu CDT kod skupine ispitanika s dijagnozom demencija drugog tipa, dok nema značajne povezanosti koncentracije proteina BDNF u plazmi s brojem bodova na podskali ADAS-Cog te razinom kognitivnog oštećenja procijenjenog skalom CDR u svim istraživanim skupinama.

5.2.3. Koncentracija moždanog neurotrofnog čimbenika u plazmi te bihevioralni i psihološki simptomi demencije

Demenciju osim kognitivnih prate i mnogi nekognitivni simptomi među kojima dominiraju poremećaji raspoloženja, apatija ili depresija, poremećaji percepcije i mišljenja, psihotični poremećaji, agitacija te razne vrste agresivnog ponašanja. U trenutačno dostupnoj literaturi vrlo je malo istraživanja djelovanja BDNF-a na razvoj navedenih simptoma. Postoje naznake da je BDNF povezan s razvojem depresije (Brunoni i sur., 2008; Duman i Monteggia, 2006) što upućuje na potencijalnu ulogu ovog neurotrofina i u razvoju simptoma depresije kod osoba s dijagnozom demencije. Periferna razina proteina BDNF (serum i plazma) u pravilu je snižena kod pacijenata s depresijom, a može se povisiti terapijom antidepresivima (Brunoni i sur., 2008; Karege i sur., 2005; Piccinni i sur., 2008). Rezultati istraživanja uloge BDNF-a iz plazme u depresiji predlažu da bi se protein BDNF mogao koristiti kao marker depresije (Brunoni i sur., 2008; Lee i Kim, 2010; Piccinni i sur., 2008). Ovaj rad istražio je povezanost koncentracije BDNF-a u plazmi s razvojem BPSD-a koristeći skalu NPI i BEHAVE-AD koje prate različite neuropsihijatrijske simptome.

U navedene simptome, prema skali NPI, ubrajaju se: deluzije (sumanutosti), halucinacije, agitacija/agresija, depresija/disforija, anksioznost, ushićenje/euforija, apatija/ravnodušnost, dezinhibicija, razdražljivost/labilnost, aberantno motoričko ponašanje, poremećaji spavanja i noćni nemir, poremećaji prehrane i apetita. Rezultati su pokazali da postoji pozitivna korelacija između koncentracije proteina BDNF u plazmi te simptoma anksioznosti, poremećaja spavanja i noćnog nemira te poremećaja prehrane i apetita. Ovi rezultati su potvrđeni nakon što su ispitanici s demencijom dodatno podijeljeni na osobe bez ikakvih simptoma na pojedinim NPI domenama i na osobe sa simptomima.

Post-mortem studije upućuju na ulogu BDNF-a u razvoju poremećaja povezanih sa stresom, kao što su poremećaji raspoloženja i anksioznost (Duman i Monteggia, 2006; Dunham i sur., 2009). Promjene razine proteina BDNF na periferiji pronađene su u anksioznim poremećajima kao što su veliki depresivni poremećaj (Molendijk i sur., 2011) te opsesivno-kompulzivni poremećaj (Maina i sur., 2010; Wang i sur., 2011). Rezultate koji pokazuju smanjenu koncentraciju proteina BDNF na periferiji (posebice u plazmi) kod anksioznih poremećaja potvrdila je i meta-analiza koja je uključila ukupno 1179 ispitanika iz 8 studija (Suliman i sur., 2013). Jedna od pretpostavki je da BDNF regulira odgovor organizma na stres djelujući preko neurotransmitterskih sustava koji reguliraju os hipotalamus-hipofiza-nadbubrežna žlijezda. Rezultati ovog rada pokazuju veću koncentraciju proteina BDNF u plazmi ispitanika s demencijom kod kojih su pronađeni simptomi anksioznosti što je suprotno od rezultata većine studija koje je Suliman sa suradnicima (2013) uključio u meta-analizu. Međutim, treba naglasiti da su značajni rezultati spomenute meta-analize posljedica značajno niže koncentracije BDNF-a kod pacijenata s opsesivno-kompulzivnim poremećajem u odnosu na kontrolne ispitanike. Kod ostalih uključenih dijagnoza ta razlika između zdravih ispitanika i ispitanika s određenim anksioznim poremećajem nije bila značajna tako da dobiveni značajni rezultat može biti posljedica povezanosti razine BDNF-a s razvojem opsesivno-kompulzivnog poremećaja, a ne sa samim anksioznim simptomima. U ovom istraživanju napravljena je usporedba unutar skupine ispitanika s demencijom bez usporedbe sa zdravim ispitanicima, a u dostupnoj literaturi nema podataka za ulogu proteina BDNF u razvoju anksioznih simptoma u demenciji.

Poremećaji spavanja (teško usnivanje, smanjena duljina spavanja tijekom noći, često buđenje tijekom noći, ružni snovi) česti su kod osoba s AB-om i javljaju se već u ranoj fazi bolesti (McCurry i sur., 1999; Moran i sur., 2005). Zna se da su poremećaji spavanja u AB-u povezani s lošijim kognitivnim funkcioniranjem i s ranijom institucionalizacijom ovih bolesnika. Postoje naznake da se poremećaji spavanja javljaju u pretkliničkoj fazi AB-a i da su posljedica nakupljanja peptida A β (Ju i sur., 2013) pa je upitno jesu li poremećaji spavanja posljedica patoloških promjena u neurodegeneraciji ili se ti poremećaji nalaze u pozadini razvoja demencije. Rezultati ovog rada upućuju na značajno višu koncentraciju BDNF-a u plazmi osoba s demencijom kod kojih su prisutni i poremećaji spavanja te noćni nemir. Problemi sa spavanjem se pojavljuju kod velikog broja mentalnih poremećaja koji se povezuju sa stresom, a pretpostavlja se da bi se u pozadini svega mogla nalaziti smanjena koncentracija BDNF-a kao posljedica djelovanja stresa (Duman i sur., 1997). U literaturi nema puno podataka o ulozi BDNF-a u poremećajima spavanja. Istraživanje koje je

proveo Giese sa suradnicima (2014) upućuje na značajnu korelaciju između stupnja ozbiljnosti nesanice i koncentracije proteina BDNF u serumu zbog značajno niže koncentracije proteina BDNF u serumu osoba s nesanicom u odnosu na kontrolne ispitanike koji nemaju nesanicu. Nesanica je samo jedna od kategorija poremećaja spavanja koja je prisutna kod osoba oboljelih od demencije. Naše istraživanje dalo je suprotne rezultate od očekivanih. Usporedba osoba s demencijom sa ili bez simptoma poremećaja spavanja i noćnog nemira pokazala je da osobe s navedenim simptomima imaju povišenu koncentraciju proteina BDNF. Povišena koncentracija BDNF-a kod ispitanika s demencijom je vjerojatno, kao što je već i rečeno, reakcija na oštećenja u SŽS-u koja se događaju u ranoj fazi bolesti, ali nije u potpunosti jasno kako se ta povišena koncentracija povezuje s razvojem poremećaja spavanja. Klein i suradnici (2013) su pokazali da je kod osoba s narkolepsijom prisutna značajno viša koncentracija proteina BDNF u serumu u odnosu na zdrave kontrole, ali sam mehanizam djelovanja povišene razine proteina BDNF kod pacijenata s narkolepsijom još uvijek nije poznat.

Protein BDNF sudjeluje i u regulaciji tjelesna mase i energetske homeostaze u organizmu (Noble i sur., 2011; Rosas-Vargas i sur., 2011; Zhang i sur., 2007), a BDNF i TrkB su eksprimirani u hipotalamičkim jezgrama koje su uključene u kontrolu hranjenja (Kernie i sur., 2000). Smanjena razina BDNF-a pronađena je kod pothranjenih žena s dijagnozom anoreksije (Monteleone i sur., 2005). Studije su pokazale da postoji pozitivna korelacija razine BDNF-a na periferiji s tjelesnom težinom kod žena (Monteleone i sur., 2004; Pillai i sur., 2012) te da se povišena razina BDNF-a u serumu može povezati s razvojem pretilosti i dijabetesa kod ženskih ispitanica (Suwa i sur., 2006). Studije na životinjskim modelima pokazale su da infuzija BDNF-a u moždano tkivo štakora smanjuje tjelesnu masu i apetit kod ovih životinja (Lapchak i Hefti, 1992; Pelleymounter i sur., 1995). Kod miševa koji su heterozigoti za gen BDNF, a imaju 50% razine BDNF-a koja je prisutna kod miševa s oba funkcionalna gena, prisutna je disfunkcija 5-HT sustava u mozgu, a životinje ubrzano dobivaju na težini u odnosu na divlji tip (Lyons i sur., 1999). Međutim, postoje i istraživanja koja upućuju na negativnu korelaciju razine BDNF-a u plazmi te dobi i tjelesne mase kod zdravih ispitanika (Lommatzsch i sur., 2005). Kod osoba koje boluju od demencije dolazi do promjene u hranidbenim navikama i pacijenti različito pokazuju povećanje ili smanjenje apetita (Ikeda i sur., 2002). Vrlo je zanimljiv podatak da postoji povezanost između pretilosti u srednjoj životnoj dobi i povećanog rizika za razvoj AB-a u kasnijoj životnoj dobi (Chiang i sur., 2007; Fitzpatrick i sur., 2009; Gustafson i sur., 2009; Whitmer i sur., 2005), ali još uvijek nije poznato koju ulogu u ovim procesima igra leptin, upalni adipokini te drugi geni uključeni u lipidnu homeostazu. Rezultati ovog istraživanja upućuju na pozitivnu korelaciju razine BDNF-a u plazmi osoba s dijagnozom demencije i domene skale NPI koja se odnosi na poremećaje prehrane i apetita. Rezultat je potvrđen i usporedbom koncentracije proteina BDNF u plazmi osoba bez simptoma poremećaja prehrane i apetita s osobama kod kojih su ti simptomi bili prisutni. Osobe s demencijom, kod kojih su bili prisutni simptomi poremećaja prehrane i apetita, imale su značajno višu razinu proteina BDNF u plazmi. Ovaj rezultat je u skladu s rezultatima nekih od navedenih istraživanja, no treba uzeti u obzir činjenicu da su sva navedena istraživanja napravljena na zdravim ispitanicima ili ispitanicima s različitim dijagnozama (npr.

depresijom). U literaturi za sada nema istraživanja koja su se fokusirala na istraživanje povezanosti proteina BDNF, demencije i poremećaja prehrane. Postoji više studija koje su istraživale povećanje tjelesne mase i količine masnog tkiva kod transgeničnih miševa koji imaju povećanu ekspresiju mutiranih formi APP-a kao odgovora na visokokaloričnu dijetu (Cao i sur., 2007; Fewlass i sur., 2004; Ho i sur., 2004; Julien i sur., 2010; Levin-Allerhand i sur., 2002; Pedrini i sur., 2009; Zhao i sur., 2005). Ova istraživanja pokazala su da se pretilost kod ovih životinjskih modela može povezati s nakupljanjem A β , a nakupljanje A β može se dovesti u korelaciju s povećanjem u razini BDNF-a.

U slučaju ukupnog broja bodova na skali BEHAVE-AD nije pronađena značajna korelacija s razinom proteina BDNF u plazmi ispitanika s dijagnozom AB-a. Ova skala ocjenjuje više kategorija simptoma koji se često javljaju kod pacijenata s dijagnozom AB-a (paranoja i deluzije, halucinacije, promjene u aktivnosti, agresija, poremećaji spavanja, raspoloženje i anksioznost). Nagata sa suradnicima (2014) pokazao je da postoji značajna pozitivna korelacija između koncentracije proteina BDNF u plazmi ispitanika s dijagnozom AB-a i agresivnosti koristeći skalu BEHAVE-AD. Kod podataka vezanih za skalu BEHAVE-AD nisu nam bili dostupni podaci za pojedine kategorije simptoma, već samo ukupan broj bodova na skali, tako da nije bilo moguće napraviti usporedbu s rezultatima dobivenima za pojedine domene skale NPI.

Iz svih dobivenih rezultata može se zaključiti da, u slučaju bihevioralnih i psiholoških simptoma evaluiranih skalom NPI, postoji pozitivna korelacija između koncentracije proteina BDNF u plazmi te simptoma anksioznosti, poremećaja spavanja i noćnog nemira te poremećaja prehrane i apetita, dok u slučaju ukupnog broja bodova na skali BEHAVE-AD nije pronađena značajna korelacija s razinom proteina BDNF u plazmi ispitanika s dijagnozom AB-a.

5.3. Polimorfizmi gena za moždani neurotrofni čimbenik i tropomiozin-receptor-kinazu B

U ovom radu istraživano je ukupno 5 polimorfizama gena BDNF i jedan SNP unutar gena za TrkB. Polimorfizam rs6265 (Val66Met) zanimljiv je jer se radi o funkcionalnom polimorfizmu koji ima ulogu u transportu i sekreciji BDNF-a u dendritima (Chen i sur., 2004; Egan i sur., 2003). Za polimorfizam rs56164415 zna se da je smješten u nekodirajućoj regiji eksona V (na poziciji 132) gena za BDNF, a mogao bi utjecati na ekspresiju gena BDNF (Huang i sur., 2007). U literaturi se polimorfizam rs56164415 može češće naći pod starom oznakom C270T (Kunugi i sur., 2001), unatoč tome što je ovaj naziv netočan s obzirom na novija saznanja o položaju ovog polimorfizma (Itoh i sur., 2005). Polimorfizmi rs7934165 i rs11030104 smješteni su u intronskim regijama gena za BDNF i mogli bi utjecati na proces alternativnog prekrajanja introna koji je odgovoran za nastanak različitih transkripta ovog gena koji se ekspimiraju različito u pojedinim tkivima kao odgovor na podražaje. Polimorfizam rs1519480 smješten je izvan kodirajuće regije gena za BDNF, ali postoje indikacije da utječe na transkripciju mRNA, tj. ekspresiju gena BDNF (Salehi i sur., 2013).

Teško je objasniti učinak polimorfizama smještenih u intronskim regijama i sinonimnih polimorfizama u istraživanim patologijama jer su to polimorfizmi koji ne utječu na slijed aminokiselina. Predloženo je da bi sinonimni polimorfizmi mogli utjecati na aktivnost proteina i njihovu specifičnost i bez izravnog učinka na aminokiselinsku sekvencu (Kimchi-Sarfaty i sur., 2007; Komar, 2007). Introni, tj. njihove sekvence su važne jer utječu na uspješnost normalnog prekrajanja i strukturno stabiliziraju pre-mRNA kako bi je zaštitili od prerane razgradnje, kontroliraju ekspresiju eksona i povećavaju produkciju proteina (Malisic i sur., 2010; Ying i sur., 2010). Jedno od objašnjenja je da su polimorfizmi izvan kodirajućih regija gena i smisleni polimorfizmi povezani s drugim kodirajućim funkcionalnim polimorfizmima unutar istog haplotipa koji je onda povezan s istraživanim fenotipom (Hahn i sur., 2011).

Gena koji kodira za TrkB ima ukupno 24 eksona, a koristeći alternativne promotore, proces alternativnog prekrajanja introna te poliadenilacijska mjesta ovaj gen može dati oko 100 različitih izoformi koje kodiraju za ukupno 10 proteina (Stoilov i sur., 2002). Unutar gena za TrkB za istraživanje je odabran SNP rs1439050, smješten u četvrtom intronu, a koji bi mogao utjecati na ekspresiju transkripata TrkB.

Kod svih polimorfizama provjereno je postoji li odstupanje raspodjele genotipova od HWE. Svi istraživani polimorfizmi nalazili su se u HWE-u zbog čega su kasnije mogli biti uključeni i u haplotipsku analizu.

5.3.1. Polimorfizmi gena za moždani neurotrofni čimbenik i tropomiozin-receptor-kinazu B kod oboljelih od demencije ili blagog kognitivnog (spoznajnog) poremećaja

U slučaju svi 6 istraživanih polimorfizama nije pronađena značajna razlika u raspodjeli genotipova i alela između skupina ispitanika s dijagnozom AB-a, ispitanika s dijagnozom demencija drugog tipa te skupine s dijagnozom MCI-a. Istraživanje je pokazalo da nema značajne razlike u frekvenciji genotipova između muških ispitanika i ženskih ispitanica unutar dijagnostičkih skupina u slučaju svih istraživanih polimorfizama, osim kod polimorfizma rs56164415. Napravljena je dodatna usporedba raspodjele genotipova s obzirom na polimorfizam rs56164415 između uspoređivanih skupina podijeljenih prema spolu koja je potvrdila negativan rezultat.

U slučaju analiziranih SNP biljega u genu BDNF u obzir treba uzeti činjenicu da ovi biljezi u genomu nisu potpuno nezavisni već se češće nasljeđuju zajedno od očekivanog. Upravo iz ovog razloga dodatno je provjereno da li se istraživani polimorfizmi nalaze u LD-u. Analiza je pokazala da su svi polimorfizmi u LD-u pa je dodatno napravljena usporedba frekvencije pojavljivanja pojedinih haplotipova unutar skupina ispitanika s AB-om, skupine s dijagnozom demencija drugog tipa te skupine s dijagnozom MCI-a. Rezultati su i u slučaju analize haplotipova pokazali da nema značajne razlike u raspodjeli između uspoređivanih skupina ispitanika. Kada je uspoređena frekvencija svakog pojedinog haplotipa i zbroja ostalih haplotipova po skupinama i dalje nije bilo značajne razlike između skupina ispitanika, ali je u slučaju haplotipa H1 (AGTCA) vidljiv trend koji upućuje na veći udio haplotipa H1 kod osoba s dijagnozom MCI-a u odnosu na ispitanike s dijagnozom demencije. Rezultat nije značajan, ali bi bilo zanimljivo provjeriti da li haplotip H1 ima potencijalan protektivan učinak na većoj skupini ispitanika.

Većina studija, u kojima je praćena distribucija genotipova polimorfizma rs6265 (Val66Met) gena BDNF između oboljelih od AB-a i zdravih kontrolnih ispitanika bijele rase, nije pokazala značajnu razliku u frekvenciji genotipova s obzirom na polimorfizam rs6265 (Val66Met) između istraživanih skupina, što pokazuje da najvjerojatnije nema značajne povezanosti između polimorfizma rs6265 (Val66Met) gena BDNF i AB-a kod pripadnika bijele rase (Bagnoli i sur., 2004; Bodner i sur., 2005; Combarros i sur., 2004; Desai i sur., 2005; Giedraitis i sur., 2009; Grunblatt i sur., 2009; Li i sur., 2008; Li i sur., 2005; Nacmias i sur., 2004; Nishimura i sur., 2004; Pivac i sur., 2011; Zhang i sur., 2006) ili kod osoba miješane rase kolumbijskog porijekla (Forero i sur., 2006a). Međutim, u mađarskoj populaciji pronađena je značajna povezanost polimorfizma rs6265 (Val66Met) i AB-a (Ventriglia i sur., 2002), a smatra se da bi alel Val mogao predstavljati rizični čimbenik za AB (Feher i sur., 2009). U Japanskoj populaciji nije pronađena značajna povezanost polimorfizama Val66Met i rs56164415 (C270T) gena BDNF s AB-om (Fukumoto i sur., 2010). Međutim, kada su bolesnici podijeljeni po spolu, dobivena je značajna povezanost polimorfizma rs6265 (Val66Met) i AB-a kod ženskih, ali ne i muških ispitanika (Fukumoto i sur., 2010).

Zbog ovog nalaza napravljena je meta-analiza na velikom broju bolesnika širom svijeta u 16 centara i pokazano je, na oko 9000 bolesnika, da je Met alel češći kod žena s AB-om te da bi mogao predstavljati rizični alel za razvoj AB-a (Fukumoto i sur., 2010). Neke druge studije, koje su također utvrdile povezanost AB-a s polimorfizmom rs6265 (Val66Met) (Bian i sur., 2005; Nishimura i sur., 2005), uputile su na protektivni učinak genotipa Val/Val kod zdravih žena kineskog porijekla u odnosu na pacijentice oboljele od AB-a. Kod ispitanika hrvatske populacije nije bilo značajnih razlika u frekvenciji pojavljivanja genotipova polimorfizma rs6265 (Val66Met) gena BDNF između oboljelih od AB-a s ranim ili kasnim početkom i kontrolnih starijih ispitanika (Pivac i sur., 2011), a također nisu pronađene ni razlike u distribuciji tih genotipova kada su svi ispitanici još dodatno podijeljeni prema spolu. Spolno ovisne razlike pronađene su između muških i ženskih bolesnika s AB-om koji su razvili psihotične simptome (Pivac i sur., 2011).

Dosadašnje studije većinom su pokazale nedostatak značajne povezanosti polimorfizma rs56164415 (C270T) gena BDNF i AB-a kod pripadnika bijele rase (Bagnoli i sur., 2004; Bodner i sur., 2005; Cousin i sur., 2011; Desai i sur., 2005; Saarela i sur., 2006; Zhang i sur., 2006) te kod Afroamerikanaca (Desai i sur., 2005). S druge strane, pronađeno je da je frekvencija pojavljivanja T alela ovog polimorfizma viša u oboljelih od AB-a u usporedbi s kontrolnim ispitanicima bijele rase njemačkog porijekla (Riemenschneider i sur., 2002a). Taj nalaz upućuje da je T alel rizični čimbenik za razvoj AB-a. Ovi rezultati su potvrđeni i na uzorcima mozгова uzetih post-mortem od osoba s kasnim oblikom AB-a te je pokazano da se T alel češće javlja kod takvih pojedinaca (Olin i sur., 2005). Temeljem tih nalaza Olin i suradnici (2005) zaključili su da je T alel rizični čimbenik za AB s kasnim početkom. Veća učestalost Val alela (polimorfizam Val66Met) i T alela (polimorfizam C270T) pronađena je i kod japanskih ispitanika s AB-om (Matsushita i sur., 2005).

Receptor TrkB je ključna komponenta signalnog puta proteina BDNF. Ovaj receptor ima tri osnovne izoforme koje nastaju alternativnim prekrajanjem pre-mRNA; cjeloviti receptor TrkB i dva oblika koja su krnja na C-terminalnom kraju proteina (Stoilov i sur., 2002). Djelovanje BDNF-a u pravilu ide preko cjelovitog oblika receptora TrkB. Istraživanja pokazuju da je u neuronima u hipokampusu i frontalnom korteksu osoba oboljelih od AB-a smanjena razina cjelovitog receptora TrkB (Allen i sur., 1999; Ferrer i sur., 1999), a slična je situacija i u glija stanicama unutar hipokampusa (Ferrer i sur., 1999). Postoje naznake da je povećana ekspresija krnjeg receptora TrkB povezana s nastankom senilnih plakova (Allen i sur., 1999; Connor i sur., 1997; Ferrer i sur., 1999). Navedena saznanja upućuju na to da je za normalno funkcioniranje neurona vrlo važno signaliziranje proteina BDNF putem receptora TrkB, a taj signalni put je narušen u AB-u, što zbog promjena u razini ekspresije proteina BDNF i TrkB, a što zbog promjena u omjeru cjelovitog i krnjeg receptora TrkB (Wong i sur., 2012). Upravo zbog ovog razloga zanimljivima se čine polimorfizmi u genu TrkB koji bi mogli imati utjecaja na alternativno prekrajanje. Istraživani polimorfizam rs1439050 gena TrkB do sada je povezan sa suicidalnim idejama kod pacijenata s velikim depresivnim poremećajem (Perroud i sur., 2009), ali istraživanja uloge polimorfizama gena TrkB u demenciji nema unutar postojeće literature.

U ovo istraživanje uključeno je ukupno 318 ispitanika što bi mogao biti premali broj ispitanika za genetička istraživanja u slučaju kada je veličina učinka mala (a što je čest slučaj kada se radi o učinku određenog gena na istraživani fenotip). Također, većina dosadašnjih istraživanja usmjerena je na usporedbu zdravih ispitanika s ispitanicima kojima je postavljena dijagnoza AB-a, a i rezultati tih istraživanja su oprečni. Upravo iz ovog razloga, puno je zanimljivija uloga pojedinih polimorfizama u razvoju određenih simptoma demencije te potencijalna razlika njihovog učinka u trima istraživanim skupinama ispitanika.

5.3.2. Polimorfizmi gena za moždani neurotrofni čimbenik i tropomiozin-receptor-kinazu B u kognitivnim simptomima demencije

Kao i u slučaju koncentracije proteina BDNF u plazmi, u ovom istraživanju analizirana je uloga svih 5 polimorfizama gena BDNF i rs1439050 polimorfizma gena za receptor TrkB u razvoju kognitivnih simptoma demencije. Stupanj kognitivnog oštećenja određen je već spomenutim psihometrijskim testovima; MMSE, CDT, ADAS-Cog i CDR.

Zbog poznatog funkcionalnog učinka na sekreciju i transport proteina BDNF u neuronima najčešće istraživani polimorfizam gena BDNF u literaturi je rs6265 (Val66Met). Ovaj polimorfizam je istraživan kako bi se objasnio mogući utjecaj neurotrofina BDNF na razvoj demencije i na razvoj kliničkih i patoloških karakteristika ove bolesti (Fahnestock, 2011; Lu i sur., 2013). Rezultati dosadašnjih istraživanja ne omogućuju donošenje jedinstvenog zaključka o ulozi ovog polimorfizma, jer su neki istraživači pokazali da je alel Met s obzirom na polimorfizam rs6265 (Val66Met) odgovoran za veće kognitivno oštećenje, atrofiju moždanog tkiva i povećani rizik za razvoj AB-a, dok druge studije spomenuta oštećenja povezuju s alelom Val (Fahnestock, 2011; Lu i sur., 2013; Voineskos i sur., 2011). Jedna od pretpostavki je da je učinak spomenutog polimorfizma pod utjecajem razine peptida A β (Lim i sur., 2014; Lim i sur., 2013). Veliki broj genetičkih studija koje su pokušale razjasniti ulogu BDNF-a u kogniciji fokusirale su se upravo na polimorfizam rs6265 (Val66Met). Rezultati ovih istraživanja nisu dosljedni, ali ih većina upućuje na lošije kognitivno funkcioniranje koje se povezuje s alelom Met. Alel Met gena BDNF povezan je s manjim brojem bodova na revidiranoj Wechsler skali memorije (WMS-R, engl. *Wechsler Memory Scale-Revised*) (Dempster i sur., 2005), a strukturna MRI analiza na zdravim ispitanicima pokazala je da nosioci alela Met imaju manji volumen hipokampusa u odnosu na homozigote Val/Val (Pezawas i sur., 2004; Szeszko i sur., 2005). Pokazano je i da nosioci alela Met imaju slabiji rezultat na Wisconsin testu sortiranja karata koji mjeri funkciju prefrontalnog korteksa (Rybakowski i sur., 2003). Hipotezu o promijenjenoj funkciji hipokampusa kod pojedinaca koji su nosioci alela Met dodatno potvrđuje i istraživanje koje je proveo Miyajima sa suradnicima (2008). Niti ostala istraživanja nisu u potpunosti razjasnila ulogu polimorfizma rs6265 (Val66Met) u kognitivnoj funkciji (Desai i sur., 2005; Nagata i sur., 2011; Tsai i sur., 2008). Polimorfizam rs56164415 (C270T) povezan je s brojem bodova na testu MMSE, a nosioci alela T sa slabijim kognitivnim funkcioniranjem (Desai i sur., 2005). Istraživanje koje je proveo Nagata sa suradnicima

(2011) nije potvrdilo ove rezultate, točnije, nije pokazalo značajan učinak polimorfizma rs56164415 (C270T) na broj bodova na testu MMSE neovisno o fazi bolesti.

Rezultati ovog istraživanja pokazali su da nema značajnog utjecaja genotipova s obzirom na sve ispitivane polimorfizme na ukupan broj bodova na testu MMSE u sve tri skupine ispitanika. Ovi rezultati su potvrđeni i nakon usporedbe raspodjele genotipova između ispitanika podijeljenih u kategorije prema broju bodova na testu MMSE za sve polimorfizme gena BDNF. U slučaju polimorfizma rs1439050 gena TrkB pronađena je značajna razlika u raspodjeli genotipova između ispitanika podijeljenih u kategorije prema broju MMSE bodova. Uočena značajna razlika je posljedica manjeg udjela homozigota GG među ispitanicima s teškim oblikom demencije u odnosu na ispitanike koji su bili u ranoj i srednjoj fazi demencije. Ova razlika je vidljiva i kada je usporedba napravljena samo unutar skupine ispitanika s dijagnozom AB-a, ponovo zbog smanjenog udjela genotipa GG u skupini ispitanika u već uznapredovanoj, kasnoj fazi AB-a. Ovi rezultati upućuju na mogući protektivni učinak genotipa GG s obzirom na polimorfizam rs1439050 gena TrkB u slučaju nastanka kognitivnog oštećenja u demenciji, čemu u prilog govori i činjenica da, među svim ispitanicima s dijagnozom demencije uključenima u istraživanje, homozigoti GG su ti koji su imali najveći broj bodova na testu MMSE, dok su heterozigoti GT imali najniži broj bodova ($F=3,41$; $df=2, 193$; $p=0,035$).

Rezultati koji uspoređuju povezanost broja bodova na testu CDT i polimorfizama gena BDNF (rs1519480, rs6265, rs56164415, rs7934165) pokazuju da nema značajne povezanosti ovih polimorfizama s kognitivnim oštećenjem procijenjenim pomoću spomenutog testa u svim istraživanim skupinama. Međutim, pronađena je značajna razlika u broju bodova na testu CDT kod osoba s dijagnozom AB-a nakon podijele prema genotipu s obzirom na polimorfizam rs1103014 gena BDNF. Ovaj rezultat predlaže da osobe koje su nosioci alela C s obzirom na polimorfizam rs1103014 imaju manji broj bodova na testu CDT, tj. imaju veće kognitivno oštećenje u odnosu na homozigote TT. Iz ovih rezultata se može zaključiti, ako budu potvrđeni na većim skupinama, da je TT genotip polimorfizma rs1103014 gena BDNF protektivan za kognitivno oštećenje koje se određuje pomoću testa CDT. Utjecaj spomenutog polimorfizma na razvoj kognitivnih simptoma procijenjenih pomoću testa CDT potvrđen je i usporedbom ispitanika s dijagnozom AB-a koji su podijeljeni na kategorije ($CDT \leq 5$ i $CDT > 5$) prema broju CDT bodova. Za razliku između bolesnika s AB-om kod kojih je prisutno veće i onih kod kojih je zabilježeno slabije kognitivno oštećenje, odgovoran je povećani udio nosioca alela C polimorfizma rs1103014 u skupini s većim kognitivnim oštećenjem. Rezultat upućuje na to da bi alel C mogao biti rizičan za razvoj težih kognitivnih simptoma kod pacijenata s AB-om.

Polimorfizam rs1439050 gena TrkB doveden je u korelaciju s brojem bodova na testu CDT kod osoba s dijagnozom ostalih oblika demencija jer su heterozigoti GT s obzirom na ovaj polimorfizam imali najniži broj bodova na testu CDT. Ovaj rezultat je sličan rezultatu dobivenom za broj bodova na testu MMSE gdje je među ispitanicima s dijagnozom demencije pronađen najmanji broj MMSE bodova kod heterozigota GT s obzirom na polimorfizam rs1439050 gena TrkB.

Također, u slučaju bodova na testu CDT, među ispitanicima s dijagnozom demencije prisutan je najmanji broj bodova kod heterozigota GT, ali ta razlika nije statistički značajna ($F=1,58$; $df=2, 144$; $p=0,210$). Ovi rezultati potvrđuju da je polimorfizam u genu za TrkB, rs1439050, povezan s kognitivnim oštećenjima u demenciji koja se određuju pomoću testa CDT, s time da je genotip GT rizičan.

Analiza povezanosti broja bodova na testu ADAS-Cog pokazala je da nema značajnog utjecaja genotipova s obzirom na sve polimorfizme gena BDNF i TrkB na ukupan broj bodova na ovoj skali, a negativni rezultat je potvrđen i nakon usporedbe ispitanika podijeljenih u kategorije prema broju bodova na skali ADAS-Cog ($ADAS-Cog < 18$ i $ADAS-Cog \geq 18$). Zanimljivo je da, kada se promatra polimorfizam rs1439050 gena TrkB u skupini bolesnika s dijagnozom AB-a ili demencija drugog tipa, ispitanici koji su homozigoti s obzirom na alel G imaju najniži broj bodova na skali ADAS-Cog što upućuje i na slabije kognitivno oštećenje, ali sam rezultat nije statistički značajan.

Povezanost ranga prema skali CDR i polimorfizama gena BDNF i TrkB analizirana je u svim skupinama ispitanika zajedno te za svaku skupinu zasebno. Rezultati su pokazali da nema povezanosti između stupnja kognitivnog oštećenja prema ovoj skali i istraživanih polimorfizama. Nakon razvrstavanja ispitanika u kombinirane skupine prema CDR rangu ($CDR-0,5 + CDR-1$, $CDR-2 + CDR-3$) pronađena je značajna razlika u distribuciji genotipova s obzirom na polimorfizam rs1519480 gena BDNF između svih uspoređenih skupina zbog većeg udjela nosioca alela G kod ispitanika s blažim oblikom demencija drugog tipa. U slučaju polimorfizma rs1519480, iz rezultata je vidljivo da u skupini ispitanika s demencijama drugog tipa postoji veći udio ispitanika nosioca alela G u odnosu na ostale skupine ispitanika, ali ta razlika nije statistički značajna. Dobiveni rezultat je velikim dijelom u skladu s istraživanjem koje je povezalo dva polimorfizma, rs1519480 i rs7124442, s oporavkom opće kognitivne inteligencije nakon traumatske ozljede mozga (Rostami i sur., 2011), a haplotipska analiza je potvrdila ovaj pozitivan rezultat. Smatra se da 3' regije, koje se nalaze izvan kodirajuće sekvence gena, utječu na usmjeravanje mRNA, translaciju i/ili razgradnju mRNA, a mogli bi utjecati i na transkript proBDNF. Regija u kojoj se nalazi rs1519480 izrazito je konzervirana, zbog čega bi ovaj SNP mogao biti funkcionalan (Rostami i sur., 2011). Polimorfizam rs1519480 povezan je i s razvojem bipolarnog poremećaja (Liu i sur., 2008).

Metodom višestruke linearne regresije analiziran je potencijalni utjecaj haplotipova gena BDNF na kognitivne simptome demencije. Rezultati su pokazali da ne postoji značajna razlika u broju bodova na testu MMSE između nosioca i ne-nosioca određenih haplotipova nakon korekcije za mogući utjecaj dijagnoze, spola i dobi. U slučaju bodova na testu CDT rezultat upućuje na to da je zadani model višestruke linearne regresije u slučaju haplotipa H1 (AGTCA) zaslužan za 3,5% varijacije u broju CDT bodova. U ovom slučaju nosioci haplotipa H1 imaju značajno veći broj bodova na testu CDT u odnosu na osobe koje nisu nosioci ovog haplotipa, nakon što se u obzir uzme korekcija s obzirom na dijagnozu, spol i dob. Ovaj rezultat odgovara rezultatu koji pokazuje da osobe s dijagnozom AB-a, koje su TT homozigoti s obzirom na polimorfizam rs1103014, imaju veći broj bodova na testu CDT.

Slično je pokazano i za haplotip H6 gdje je model višestruke linearne regresije zaslužan za 11,2% varijacije na skali ADAS-Cog, ali tu treba uzeti u obzir i činjenicu da među ispitanicima uključenima u istraživanje ima vrlo malo nosioca haplotipa H6 što može utjecati na rezultat. Kod rezultata logističke regresije koji su analizirali utjecaj pojedinih haplotipova na rang na skali CDR vidljivo je da nema značajne razlike u stupnju demencije prema skali CDR između nosioca i ne-nosioca određenih haplotipova nakon korekcije za dijagnozu, spol i dob ispitanika.

Dobiveni rezultati nisu u skladu s rezultatima koje je objavio Honea sa suradnicima (2013), a koji se odnose na utjecaj ukupno 13 SNP-ova gena BDNF (rs6265 (Val66Met), rs12273363, rs11030094, rs925946, rs1050187, rs2203877, rs11030104, rs11030108, rs10835211, rs7934165, rs908867, rs1491850, rs1157459) na kognitivne sposobnosti, volumen hipokampusa i ukupni volumen mozga, atrofiju hipokampusa i cijelog moždanog tkiva te razinu promjene u bodovima na skali ADAS-Cog. Međutim, od navedenih 13 SNP-ova u ovom radu su istraživana 3 polimorfizma (rs6265 (Val66Met), rs11030104 i rs7934165). Rezultati rada kojeg je objavio Honea sa suradnicima (2013) povezuju tri polimorfizma (rs1157659, rs11030094, rs11030108) s kognitivnim oštećenjem, a šest polimorfizama (rs908867, rs11030094, rs6265, rs10501087, rs1157659, rs1491850) pokazalo je značajnu povezanost s atrofiom tkiva u hipokampusu i cijelom mozgu (Honea i sur., 2013). Također, uočena je i interakcija rs6265 (Val66Met) i dobi s ukupnim volumenom mozga (Honea i sur., 2013).

Na temelju dobivenih rezultata može se na kraju zaključiti da nema značajnog utjecaja genotipova s obzirom na sve ispitivane polimorfizme na ukupan broj bodova na testu MMSE u sve tri skupine ispitanika, osim u slučaju polimorfizma rs1439050 gena TrkB gdje postoji značajna razlika u raspodjeli genotipova između ispitanika podijeljenih u kategorije prema broju MMSE bodova. Također, rezultati potvrđuju da nema značajne povezanosti istraživanih polimorfizama gena BDNF s kognitivnim oštećenjem procijenjenim pomoću testa CDT u svim istraživanim skupinama. Međutim, pronađena je značajna razlika u broju bodova na testu CDT kod osoba s dijagnozom AB-a nakon podijele prema genotipu s obzirom na polimorfizam rs1103014 gena BDNF. Polimorfizam rs1439050 gena TrkB doveden je u korelaciju s brojem bodova na testu CDT kod osoba s dijagnozom ostalih oblika demencija. Rezultati su potvrdili i nedostatak povezanosti stupnja kognitivnog oštećenja prema skali CDR te skali ADAS-Cog i istraživanih polimorfizama. Nakon razvrstavanja ispitanika u kombinirane skupine prema CDR rangu pronađena je značajna razlika u distribuciji genotipova s obzirom na polimorfizam rs1519480 gena BDNF između svih uspoređenih skupina. U slučaju analize haplotipova gena BDNF, nije pronađena značajna razlika u broju bodova na testu MMSE i skali CDR između nosioca i ne-nosioca određenih haplotipova nakon korekcije za mogući utjecaj dijagnoze, spola i dobi. Međutim, u slučaju bodova na testu CDT, zadani model višestruke linearne regresije za haplotip H1 zaslužan je za 3,5% varijacije u broju CDT bodova. Značajan model višestruke linearne regresije upućuje i na to da je haplotip H6 zaslužan za 11,2% varijacije koja je vidljiva na skali ADAS-Cog.

5.3.3. Polimorfizmi gena za moždani neurotrofni čimbenik i tropomiozin-receptor-kinazu B u bihevioralnim i psihološkim simptomima demencije

Kao što je već ranije spomenuto, izrazito je zanimljiva, ne samo uloga BDNF-a u kogniciji, tj. u kognitivnim simptomima demencije, već i njegova potencijalna uloga u razvoju BPSD-a, ali još uvijek ima vrlo malo istraživanja koja se bave upravo tom ulogom BDNF-a.

Za sada nema veliki broj studija koje su istraživale ulogu BDNF-a u bihevioralnim simptomima demencije. Borroni je sa suradnicima (Borroni i sur., 2009a; Borroni i sur., 2010; Borroni i sur., 2009b) pokazao da postoji povezanost funkcionalnog polimorfizma rs6265 (Val66Met) koji se nalazi u genu za BDNF i simptoma depresije kod osoba kojima je dijagnosticirana demencija. U navedenoj studiji je pokazano da postoji korelacija između broja alela Met kod pojedinaca s AB-om i rizika od pojave komorbidne depresije kod tih pojedinaca (Borroni i sur., 2009a; Borroni i sur., 2010). Naši rezultati su također pokazali da se spomenuti polimorfizam gena za BDNF može povezati i s razvojem psihotičnih simptoma kod muških ispitanika s AB-om (Pivac i sur., 2011). Naše istraživanje upućuje na to da muški pacijenti, koji boluju od AB-a i koji su nosioci jednog ili dva Met alela, imaju povećani rizik da razviju psihotične simptome u demenciji. Vrlo visoka incidencija depresije (23-51%) kod osoba s AB-om upućuje na potencijalnu vezu između kognitivnih funkcija i depresije. Uočena smanjena koncentracija BDNF-a kod pacijenata s AB-om, ali i kod pacijenata koji boluju od depresije, upućuje da bi BDNF mogao povezivati ova dva poremećaja objašnjavajući tako depresivne simptome u AB-u te kognitivna oštećenja kod depresije.

Rezultati višestruke linearne regresije, u kojoj su svi ispitanici podijeljeni prema genotipu s obzirom na ispitivane polimorfizme, pokazuju da u slučaju polimorfizma rs1519480 postoji značajan utjecaj na broj bodova vezanih za domenu koja se odnosi na simptome depresije/distrofije, ali sam model višestruke linearne regresije nije značajan nakon korekcije za utjecaj dobi i spola tako da se ne može govoriti o značajnom rezultatu. U slučaju simptoma halucinacija te poremećaja spavanja i noćnog nemira vidljiv je određeni trend, ali ne može se zaključiti da postoji značajan učinak polimorfizma rs1519480 na razvoj ovih simptoma kod osoba s demencijom.

Analiza metodom višestruke linearne regresije pokazala je da postoji značajna razlika u broju bodova vezanih za domenu koje se odnosi na apatiju/ravnodušnost između ispitanika s različitim genotipovima (AA, AG, GG) s obzirom na polimorfizam rs7934165, a navedeni model, nakon korekcije za spol i dob, zaslužan je za 8,6% varijacije u broju bodova na domeni NPI-G. Ako se uspoređi razlika u broju bodova na domeni NPI-G između pojedinih genotipova s obzirom na navedeni polimorfizam, tada je očito da je značajna razlika posljedica većeg broja bodova kod homozigota GG u odnosu na druga dva genotipa ($F=4,13$; $df=2, 161$; $p=0,018$). U slučaju simptoma poremećaja spavanja i noćnog nemira ponovo je vidljiv određeni trend, ali se ne može zaključiti da postoji značajan učinak polimorfizma rs7934165 na razvoj ovih simptoma kod osoba s demencijom.

Učinak ostalih polimorfizama na ukupan broj bodova na skali NPI te na broj bodova vezan za pojedine domene NPI-a nije bio značajan. Pojedini modeli višestruke linearne regresije su značajni, ali samo zbog utjecaja drugih varijabli za koje je model korigiran (prvenstveno zbog utjecaja dobi).

Metodom višestruke linearne regresije analiziran je i potencijalni utjecaj haplotipova gena BDNF na BPSD. Rezultati su pokazali da postoji značajna razlika u broju bodova vezanih za domenu NPI-A (deluzije) i domenu NPI-G (apatija/ravnodušnost) između nosioca i ne-nosioca haplotipa H1, nakon korekcije za mogući utjecaj spola i dobi. Rezultat upućuje na to da je zadani model odgovoran za 9,4% varijacija u broju bodova na domeni NPI-A i 9,3% varijacija na domeni NPI-G. Ako se usporedi samo razlika u broju bodova na domeni NPI-A između nosioca i ne-nosioca haplotipa H1 tada je vidljivo da nosioci ovog haplotipa imaju veći broj bodova na domeni NPI-A, tj. izraženije simptome deluzija ($F=5,01$; $df=1,114$; $p=0,027$), a rezultat ostaje značajan i nakon korekcije za utjecaj spola i dobi. U slučaju domene NPI-G, nosioci haplotipa H1 imaju značajno slabije izražene simptome apatije/ravnodušnosti ($F=8,33$; $df=1,162$; $p=0,004$). Ovaj rezultat je u skladu s rezultatom koji potvrđuje da je zapravo genotip GG polimorfizma rs7934165 taj koji se povezuje s izraženijim simptomima apatije/ravnodušnosti, dok bi alel T trebao biti povezan s manjim brojem bodova na domeni NPI-G kao što je i slučaj s haplotipom H1. U slučaju haplotipa H3 pronađena je značajna razlika u broju bodova vezanih za domenu NPI-K (poremećaji spavanja i noćni nemir), a rezultat upućuje da je zadani model odgovoran za 7,4% varijacije u broju bodova vezanih za ovu domenu. U ovom slučaju nosioci haplotipa H3 imaju manji broj bodova na domeni NPI-K u odnosu na druge ispitanike i ta je razlika značajna kada se u obzir uzme učinak spola i dobi. U slučaju broja bodova na domeni NPI-L, koja se odnosi na simptome poremećaja prehrane i apetita, također postoji značajan utjecaj navedenog polimorfizma na broj bodova vezanih za ovu domenu, ali model višestruke linearne regresije nije značajan nakon korekcije za utjecaj dobi i spola. Usporedba nosioca i ne-nosioca haplotipa H6, nakon korekcije za utjecaj spola i dobi, s obzirom na broj bodova na skali NPI i njezinim domenama pokazala je da postoji značajna razlika između ovih skupina u broju bodova na domeni NPI-G (apatija/ravnodušnost) koja je posljedica značajno većeg broja bodova na navedenoj domeni kod nosioca haplotipa H6 u odnosu na druge ispitanike ($F=5,99$; $df=1, 162$; $p=0,015$), a razlika je značajna i nakon korekcije za utjecaj spola i dobi.

Temeljem dobivenih rezultata može se zaključiti da postoji značajan utjecaj polimorfizma rs1519480 na broj bodova vezanih za domenu NPI-a koja se odnosi na simptome depresije/distrofije, ali sam model višestruke linearne regresije nije značajan nakon korekcije za utjecaj dobi i spola. Također, postoji i značajna razlika u broju bodova vezanih za domenu NPI-a koje se odnosi na apatiju/ravnodušnost između ispitanika s različitim genotipovima s obzirom na polimorfizam rs7934165, a navedeni model, nakon korekcije za spol i dob, zaslužan je za 8,6% varijacije u broju bodova na domeni NPI-G. U slučaju utjecaja pojedinih polimorfizama gena BDNF i TrkB na ukupan broj bodova na skali BEHAVE-AD, rezultati višestruke linearne regresije potvrdili su da ispitivani polimorfizmi nemaju značajan utjecaj na promatranu ovisnu varijablu nakon što je model korigiran za učinak spola i dobi.

Niti u slučaju analize haplotipova gena BDNF nije pronađena značajna razlika u broju bodova na skali BEHAVE-AD. Iz dobivenih rezultata vezanih za analizu haplotipova, na kraju može se zaključiti da je prisutna značajna razlika u broju bodova vezanih za domenu NPI-A (deluzije) i domenu NPI-G (apatija/ravnodušnost) između nosioca i ne-nosioca haplotipa H1, nakon korekcije za mogući utjecaj spola i dobi, a zadani model odgovoran je za 9,4% varijacije u broju bodova na domeni NPI-A i 9,3% varijacije na domeni NPI-G. Također, potvrđena značajna razlika u broju bodova vezanih za domenu NPI-K (poremećaji spavanja i noćni nemir), između nosioca i ne-nosioca haplotipa H3, upućuje da je zadani model odgovoran za 7,4% varijacije u broju bodova vezanih za ovu domenu. U slučaju broja bodova na domeni NPI-G (apatija/ravnodušnost) pronađena je značajna razlika između nosioca i ne-nosioca haplotipa H6, nakon korekcije za utjecaj spola i dobi.

5.4. Polimorfizmi gena za moždani neurotrofni čimbenik te tropomiozin-receptor-kinazu B i koncentracija moždanog neurotrofnog čimbenika u plazmi

Kako bi provjerili postoji li značajan utjecaj istraživanih polimorfizama na razinu proteina BDNF u plazmi, napravljena je analiza metodom dvosmjerne ANOVA-e u koju su kao kofaktori uvršteni dijagnoza ispitanika (MCI vs AB vs demencije drugog tipa), genotipovi svakog od polimorfizama te dobiveni haplotipovi. Rezultati su pokazali da je skoro kod svih analiza prisutan značajan utjecaj dijagnoze na koncentraciju proteina BDNF u plazmi, što odgovara prethodno dobivenim rezultatima u ovom istraživanju. Analiza je također pokazala da unutar ispitivanih skupina nije bilo značajnog utjecaja istraživanih polimorfizama i haplotipova na vrijednosti koncentracije proteina BDNF u plazmi, kada su polimorfizmi promatrani kao zaseban faktor ili u kombinaciji s dijagnozom. Iz ovog rezultata može se zaključiti da niti jedan od analiziranih polimorfizama, čak i nakon kombinacije u haplotipove, ne mijenja koncentraciju proteina BDNF u plazmi. Ovaj rezultat u pravilu odgovara podacima u literaturi (Chen i sur., 2014; Jiang i sur., 2009; Terracciano i sur., 2010; Trajkovska i sur., 2007) i upućuje na to da dobivene rezultate vezane za ulogu koncentracije BDNF-a u razvoju demencije i simptoma ove bolesti ne treba dodatno korigirati i za utjecaj istraživanih polimorfizama gena BDNF i TrkB.

Dobiveni rezultati su oprečni rezultatima istraživanja koje su proveli Lang i suradnici (Lang i sur., 2009). Navedeno istraživanje predlaže da polimorfizam rs6265 (Val66Met) utječe na koncentraciju BDNF-a u serumu zdravih osoba na način da nosioci alela Met imaju veću razinu BDNF-a što je suprotno očekivanjima. Studija napravljena na ispitanicima s dijagnozom depresije ponudila je suprotan rezultat, tj. pokazala je nižu koncentraciju BDNF-a u serumu osoba koje su nosioci alela Met (Ozan i sur., 2010). Postoje i veliki broj drugih studija koje su pokazale da ne postoji genetički utjecaj na koncentraciju BDNF-a na periferiji kod zdravih ispitanika (Jiang i sur., 2009; Trajkovska i sur., 2007), ispitanika s dijagnozom bipolarnog poremećaja i shizofrenije (Chen i sur., 2014) te u slučaju osobina ličnosti koje se povezuju s depresijom (Terracciano i sur., 2010).

Odnos ostalih analiziranih polimorfizama (rs1519480, rs11030104, rs56164415, rs7934165, rs1439050) i koncentracije BDNF-a u plazmi do sada nije istraživan, a u slučaju dobivenih rezultata ovog istraživanja te rezultata drugih studija, treba uzeti u obzir i činjenicu da je većina istraživanja provedena na određenim dijagnostičkim kategorijama što sigurno utječe na dobivene rezultate.

5.5. Ekspresija gena za moždani neurotrofni čimbenik i sortirajući receptor prekursora peptida amiloid- β

Istraživanja su pokazala da postoji smanjena ekspresija gena BDNF na razini mRNA i na proteinskoj razini u različitim regijama mozga kod osoba s AB-om te u području substantije nigre kod pacijenata s PB-om (Murer i sur., 2001; Peng i sur., 2005). U slučaju drugih tipova demencije pronađena je smanjena razina BDNF-a kod pacijenata s dijagnozom FTD-a i DLB-a (Ferrer i sur., 2000; Imamura i sur., 2005). Poremećaji u sintezi BDNF-a povezani su i s glavnim karakteristikama patogeneze neurodegenerativnih poremećaja (Mattson, 2008) kao što je nedostatak BDNF-a u neuronima u kojima su detektirani neurofibrilarni snopići (Murer i sur., 1999). Nedostatak sinteze i sekrecije BDNF-a povezan je i s mutacijama α -sinukleina kod pacijenata s nasljednim oblikom PB-a (Kohno i sur., 2004).

BDNF regulira ekspresiju gena SORL1 (Rohe i sur., 2009) kontrolirajući na taj način prijenos proteina APP između GA i ranih endosoma (Andersen i sur., 2005). Produkt gena SORL1, receptor SORLA, blokira prijenos proteina APP u unutarstanične odjeljke koji sadrže β -sekretazu i tako sprječava nastanak A β . Inducirajući ekspresiju gena koji kodira za receptor SORLA, BDNF smanjuje nastanak A β te u slučaju AB-a najvjerojatnije pokušava kompenzirati povećanu akumulaciju ovog peptida. Pokazano je da je uz protein SORLA u regulaciju cijepanja i prijenosa APP-a uključen i sortilin koji potiče cijepanje APP-a α -sekretazom u normalnim uvjetima (Gustafsen i sur., 2013). Sortilin je važan za sekreciju proteina BDNF (Chen i sur., 2005), a zanimljivo je da je upravo sortilin ključan koreceptor za proapoptotičko signaliziranje proBDNF-a putem p75NTR (Nykjaer i sur., 2004; Teng i sur., 2005) i da A β , djelujući preko p75NTR, može povećati ekspresiju sortilina (Saadipour i sur., 2013). Smatra se da u AB-u zbog pretjerane akumulacije A β i ekspresije proBDNF-a dolazi do povećane interakcije sortilina i p75NTR što sprječava njihovu funkciju u pravilnom procesiranju APP-a (Coulson i Nykjaer, 2013). Sve navedeno pokazuje višestruku interakciju između neurotrofinskih signalnih puteva i metabolizma APP-a i A β .

BDNF nije samo prisutan u SŽS-u već je prisutan u velikim količinama i u trombocitima (Fujimura i sur., 2002), ali i u epitelnim i vaskularnim stanicama, mišićnim stanicama, makrofazima i leukocitima (Cattaneo i sur., 2010; Gielen i sur., 2003; Nakahashi i sur., 2000). Istraživanje BDNF-a u perifernim tkivima zanimljivim čine i dokazi o mogućnosti prelaska krvno-moždane barijere u slučaju ovog neurotrofina (Pan i sur., 1998a; Pan i sur., 1998b; Poduslo i Curran, 1996). Periferne stanice, kao što su npr. limfociti, predloženi su već davno kao model za proučavanje biokemije i molekularne biologije vezano za SŽS, a time i za istraživanje različitih psihijatrijskih poremećaja (Dolman, 1984). Postoje dokazi da bijele krvne stanice ekspimiraju BDNF (Braun i sur., 1999; Gielen i sur., 2003; Kerschensteiner i sur., 1999), što sve ide u prilog istraživanju promjena u ekspresiji i koncentraciji BDNF-a na perifernim modelima u svrhu potrage za novim biomarkerima za praćenje psihijatrijskih i neurodegenerativnih poremećaja.

Upravo iz navedenih razloga u ovom istraživanju je analizirana ekspresija gena BDNF i SORL1 u perifernim mononuklearnim stanicama krvi kod ispitanika s dijagnozom AB-a i onih s dijagnozom MCI-a. Analiza mRNA ekspresije napravljena je na manjem broju ispitanika, a rezultati su pokazali da nema značajne razlike u ekspresiji gena BDNF i gena SORL1 između ispitanika s AB-om i ispitanika s dijagnozom MCI-a. Međutim, u slučaju gena BDNF vidljiv je trend koji upućuje na smanjenu razinu ekspresije u perifernim mononuklearnim stanicama krvi ispitanika s AB-om u odnosu na osobe s dijagnozom MCI-a. Rezultati pokazuju da je relativna ekspresija mRNA gena BDNF u odnosu na gen ACTB smanjena oko 3 puta kod pacijenata s dijagnozom AB-a u odnosu na ispitanike kojima je dijagnosticiran MCI.

Dobiveni rezultati su u skladu s rezultatima iz literature koji upućuju na smanjenu razinu BDNF-a u mozgu oboljelih od AB-a (Connor i sur., 1997; Narisawa-Saito i sur., 1996; Siegel i Chauhan, 2000), ali ne i s rezultatima ovog rada koji se odnose na koncentraciju proteina BDNF u plazmi. Oprečnost rezultata vezanih za ekspresiju mRNA gena BDNF i rezultata koji se odnose na koncentraciju proteina BDNF najvjerojatnije su posljedica činjenice da su osobe s dijagnozom AB-a, koje su uključene u analizu ekspresije gena, bile već u uznapredovanoj fazi bolesti (imale su prosječan broj bodova na testu MMSE $6,6 \pm 4,7$; raspon od 2 do 13). U navedenoj fazi bolesti dolazi do smanjene ekspresije gena BDNF (Angelucci i sur., 2010; Laske i sur., 2006). Također, osobe s dijagnozom MCI-a koje su uključene u ovaj dio istraživanja imale su puno bolje kognitivne sposobnosti (imale su prosječan broj bodova na testu MMSE $28,0 \pm 0,9$; raspon od 27 do 29) u odnosu na skupinu s dijagnozom MCI-a koja je korištena u analizama vezanima za koncentraciju BDNF-a u plazmi. U slučaju koncentracije proteina BDNF u plazmi, glavna razlika je bila u većoj koncentraciji ovog neurotrofina kod osoba u srednjoj fazi AB-a u odnosu na ispitanike s dijagnozom MCI-a. U slučaju analiziranja koncentracije BDNF-a u plazmi ispitanika uključenih u istraživanje, osobe u kasnoj fazi AB-a imale su manju koncentraciju BDNF-a u odnosu na osobe u srednjoj fazi bolesti, tj. imale su sličnu koncentraciju BDNF-a kao i ispitanici s dijagnozom MCI-a. Kod usporedbe ekspresije gena BDNF i gena SORL1 odabrani su pacijenti koji su pokazivali vrlo malo kognitivnih oštećenja te pacijenti kod kojih je demencija uznapredovala, kako bi se pokušala uhvatiti razlika u ekspresiji istraživanih gena. Dodatna analiza ekspresije gena BDNF na većem broju ispitanika mogla bi dati pouzdaniji rezultat.

Rezultati ovog istraživanja nisu u skladu s rezultatima koji pokazuju da postoji smanjena ekspresija gena SORL1 u mozgu pacijenata s dijagnozom AB-a (Dodson i sur., 2006). U prilog navedenim istraživanjima ide i činjenica da su genetičke varijante gena SORL1 povezane s povećanim rizikom za razvoj AB-a (Bettens i sur., 2008; Lee i sur., 2007; Rogaeva i sur., 2007). Rohe i suradnici (2009) pokazali su da BDNF inhibira procesiranje APP-a na taj način da potiče ekspresiju gena SORL1 aktivacijom signalnih puteva kinaze MAP. Također, potpunom inaktivacijom gena SORL1, BDNF gubi svoj negativni učinak na nastanak peptida A β (Rohe i sur., 2009). Upravo iz ovog razloga bilo je zanimljivo provjeriti da li postoji razlika u ekspresiji gena BDNF i gena SORL1 između ispitanika s AB-om i onih s dijagnozom MCI-a. Očekivana je smanjena ekspresija gena BDNF kod ispitanika s AB-om koja korelira sa smanjenom ekspresijom gena SORL1.

Rezultati su pokazali smanjenu relativnu ekspresiju gena BDNF kod ispitanika s dijagnozom AB-a, ali i nepromijenjenu razliku relativne ekspresije gena SORL1. Odstupanje od očekivanih rezultata može biti posljedica različitih procesa koji zahvaćaju periferne mononuklearne stanice krvi, a koji ne prate stanje u SŽS-u.

6. ZAKLJUČCI

Rezultati istraživanja potvrdili su hipoteze da su promjene u koncentraciji BDNF-a povezane s razvojem demencije te da su, uz koncentraciju BDNF-a u plazmi, različite genetičke varijante gena za BDNF i TrkB povezane s pojavom i ozbiljnosti kognitivnih te bihevioralnih i psiholoških simptoma demencije. Analiza ekspresije gena BDNF i SORL1 nije potvrdila očekivanu značajnu razlika u ekspresiji ovih gena između pojedinaca s dijagnozom AB-a i onih s dijagnozom MCI-a, unatoč tome što je u slučaju gena BDNF vidljiv trend koji upućuje na smanjenu razinu ekspresije ovog gena kod ispitanika u kasnoj fazi AB-a. Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti da je istraživanje ponudilo određene lako dostupne biokemijske i genetičke pokazatelje koji bi u budućnosti mogli doprinijeti pravovremenoj dijagnostici demencije, ublažavanju simptoma bolesti te boljem praćenju progresije bolesti i odgovora na terapiju.

Zaključci:

1. Koncentracija proteina BDNF povišena je u plazmi osoba s dijagnozom AB-a u odnosu na skupinu bolesnika kojima je dijagnosticiran MCI ili FTD te u odnosu na ispitanike unutar kombinirane skupine demencija drugog tipa.
2. S obzirom na ozbiljnost kognitivnih simptoma demencije, određenih prema broju MMSE bodova, pronađena je značajno viša koncentracija proteina BDNF u plazmi ispitanika u srednjoj fazi AB-a u odnosu na pacijente u ranoj i kasnoj fazi AB-a te u odnosu na ispitanike s MCI-em i ispitanike s dijagnozom demencija drugog tipa. Postoji pozitivna korelacija između koncentracije proteina BDNF i broja bodova na testu CDT kod skupine ispitanika s dijagnozom demencija drugog tipa.
3. S obzirom na bihevioralne i psihološke simptome, postoji pozitivna korelacija između koncentracije proteina BDNF u plazmi te simptoma anksioznosti, poremećaja spavanja i noćnog nemira te poremećaja prehrane i apetita.
4. Kod svih 5 istraživanih polimorfizama (rs6264, rs11030104, rs7934165, rs1519480, rs56164415) gena BDNF i polimorfizma rs1439050 gena TrkB, nema značajne razlike u raspodjeli genotipova i alela između skupina ispitanika s dijagnozom AB-a, ispitanika s dijagnozom demencija drugog tipa te skupine s dijagnozom MCI-a.
5. Postoji značajna razlika u raspodjeli genotipova polimorfizma rs1439050 gena TrkB između ispitanika podijeljenih u kategorije prema broju MMSE bodova. Kod osoba s dijagnozom AB-a postoji razlika u broju bodova na testu CDT nakon podijele prema genotipu s obzirom na polimorfizam rs1103014 gena BDNF. Polimorfizam rs1439050 gena TrkB u korelaciji je s brojem bodova na testu CDT kod osoba s dijagnozom ostalih oblika demencija. Nakon razvrstavanja ispitanika u kombinirane skupine prema CDR rangu, postoji značajna razlika u distribuciji genotipova s obzirom na polimorfizam rs1519480 gena BDNF između svih uspoređenih skupina.
6. Postoji značajna razlika u broju bodova vezanih za domenu skale NPI koje se odnosi na apatiju/ravnodušnost (NPI-G) između ispitanika s različitim genotipovima s obzirom na

- polimorfizam rs7934165, a navedeni model, nakon korekcije za spol i dob, zaslužen je za 8,6% varijacije u broju bodova na domeni NPI-G.
7. U slučaju raspodjele haplotipova gena BDNF, zadani model višestruke linearne regresije, koji se odnosi na povezanost broja bodova na testu CDT i haplotipa H1, zaslužen je za 3,5% varijacije u broju CDT bodova. Značajan model višestruke linearne regresije upućuje na to da je haplotip H6 zaslužen za 11,2% varijacije koja je vidljiva na skali ADAS-Cog.
 8. Postoji značajna razlika u broju bodova vezanih za domenu NPI-A (deluzije) i domenu NPI-G (apatija/ravnodušnost) između nosioca i ne-nosioca haplotipa H1, nakon korekcije za mogući utjecaj spola i dobi, a zadani model odgovoran je za 9,4% varijacije u broju bodova na domeni NPI-A i 9,3% varijacije na domeni NPI-G. Značajna razlika u broju bodova vezanih za domenu NPI-K (poremećaji spavanja i noćni nemir) između nosioca i ne-nosioca haplotipa H3 upućuje da je zadani model odgovoran za 7,4% varijacije u broju bodova vezanih za ovu domenu. Postoji i značajna razlika između nosioca i ne-nosioca haplotipa H6, nakon korekcije za utjecaj spola i dobi, s obzirom na broj bodova na domeni NPI-G (apatija/ravnodušnost).
 9. Niti jedan od analiziranih polimorfizama, čak i nakon kombinacije u haplotipove, ne utječe na koncentraciju proteina BDNF u plazmi.
 10. Nema značajne razlike u ekspresiji gena BDNF i SORL1 između ispitanika s AB-om i ispitanika s dijagnozom MCI-a, ali je u slučaju gena BDNF vidljiv trend koji upućuje na smanjenu razinu ekspresije u perifernim mononuklearnim stanicama krvi ispitanika u kasnoj fazi AB-a.

LITERATURA

- Aggarwal N. T., Bienias J. L., Bennett D. A., Wilson R. S., Morris M. C., Schneider J. A., Shah R. C., Evans D. A. (2006) The relation of cigarette smoking to incident Alzheimer's disease in a biracial urban community population. *Neuroepidemiology* 26:140-146.
- Ainslie N. K., Murden R. A. (1993) Effect of education on the clock-drawing dementia screen in non-demented elderly persons. *Journal of the American Geriatrics Society* 41:249-252.
- Akatsu H., Yamagata H. D., Kawamata J., Kamino K., Takeda M., Yamamoto T., Miki T., Tooyama I., Shimohama S., Kosaka K. (2006) Variations in the BDNF gene in autopsy-confirmed Alzheimer's disease and dementia with Lewy bodies in Japan. *Dementia and geriatric cognitive disorders* 22:216-222.
- Akomolafe A., Beiser A., Meigs J. B., Au R., Green R. C., Farrer L. A., Wolf P. A., Seshadri S. (2006) Diabetes mellitus and risk of developing Alzheimer disease: results from the Framingham Study. *Archives of neurology* 63:1551-1555.
- Albani D., Prato F., Tettamanti M., Lovati C., Galimberti D., Restelli I., Mariani C., Quadri P. L., Scarpini E., Lucca U., i sur. (2009) The serotonin transporter promoter polymorphic region is not a risk factor for Alzheimer's disease related behavioral disturbances. *J Alzheimers Dis* 18:125-130.
- Allen S. J., Wilcock G. K., Dawbarn D. (1999) Profound and selective loss of catalytic TrkB immunoreactivity in Alzheimer's disease. *Biochemical and biophysical research communications* 264:648-651.
- Andersen O. M., Reiche J., Schmidt V., Gotthardt M., Spoelgen R., Behlke J., von Arnim C. A., Breiderhoff T., Jansen P., Wu X., i sur. (2005) Neuronal sorting protein-related receptor sorLA/LR11 regulates processing of the amyloid precursor protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102:13461-13466.
- Angelucci F., Bernardini S., Gravina P., Bellincampi L., Trequattrini A., Di Iulio F., Vanni D., Federici G., Caltagirone C., Bossu P., i sur. (2009) Delusion symptoms and response to antipsychotic treatment are associated with the 5-HT2A receptor polymorphism (102T/C) in Alzheimer's disease: a 3-year follow-up longitudinal study. *J Alzheimers Dis* 17:203-211.
- Angelucci F., Spalletta G., di Iulio F., Ciaramella A., Salani F., Colantoni L., Varsi A. E., Gianni W., Sancesario G., Caltagirone C., i sur. (2010) Alzheimer's disease (AD) and Mild Cognitive Impairment (MCI) patients are characterized by increased BDNF serum levels. *Current Alzheimer research* 7:15-20.
- Anttila T., Helkala E. L., Viitanen M., Kareholt I., Fratiglioni L., Winblad B., Soininen H., Tuomilehto J., Nissinen A., Kivipelto M. (2004) Alcohol drinking in middle age and subsequent risk of mild cognitive impairment and dementia in old age: a prospective population based study. *Bmj* 329:539.
- APA (2000) American Psychiatric Association: Diagnostic and statistical manual of mental disorders, 4th ed., text rev.). Washington, DC: Author.
- Apostolova L. G., Dutton R. A., Dinov I. D., Hayashi K. M., Toga A. W., Cummings J. L., Thompson P. M. (2006) Conversion of mild cognitive impairment to Alzheimer disease predicted by hippocampal atrophy maps. *Archives of neurology* 63:693-699.
- Aprahamian I., Martinelli J. E., Neri A. L., Yassuda M. S. (2010) The accuracy of the Clock Drawing Test compared to that of standard screening tests for Alzheimer's disease: results from a study of Brazilian elderly with heterogeneous educational backgrounds. *International psychogeriatrics / IPA* 22:64-71.
- Arentoft A., Sweat V., Starr V., Oliver S., Hassenstab J., Bruehl H., Tersi A., Javier E., McHugh P. F., Convit A. (2009) Plasma BDNF is reduced among middle-aged and elderly women with impaired insulin function: evidence of a compensatory mechanism. *Brain and cognition* 71:147-152.
- Arvanitakis Z., Wilson R. S., Bienias J. L., Evans D. A., Bennett D. A. (2004) Diabetes mellitus and risk of Alzheimer disease and decline in cognitive function. *Archives of neurology* 61:661-666.

- Assal F., Alarcon M., Solomon E. C., Masterman D., Geschwind D. H., Cummings J. L. (2004) Association of the serotonin transporter and receptor gene polymorphisms in neuropsychiatric symptoms in Alzheimer disease. *Archives of neurology* 61:1249-1253.
- Auer S. R., Monteiro I. M., Reisberg B. (1996) The Empirical Behavioral Pathology in Alzheimer's Disease (E-BEHAVE-AD) Rating Scale. *International psychogeriatrics / IPA* 8:247-266.
- Baba M., Nakajo S., Tu P. H., Tomita T., Nakaya K., Lee V. M., Trojanowski J. Q., Iwatsubo T. (1998) Aggregation of alpha-synuclein in Lewy bodies of sporadic Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *The American journal of pathology* 152:879-884.
- Bagnoli S., Nacmias B., Tedde A., Guarnieri B. M., Cellini E., Petrucci C., Bartoli A., Ortenzi L., Sorbi S. (2004) Brain-derived neurotrophic factor genetic variants are not susceptibility factors to Alzheimer's disease in Italy. *Annals of neurology* 55:447-448.
- Baj G., Tongiorgi E. (2009) BDNF splice variants from the second promoter cluster support cell survival of differentiated neuroblastoma upon cytotoxic stress. *Journal of cell science* 122:36-43.
- Bakker E., van Broeckhoven C., Haan J., Voorhoeve E., van Hul W., Levy E., Lieberburg I., Carman M. D., van Ommen G. J., Frangione B., i sur. (1991) DNA diagnosis for hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis (Dutch type). *American journal of human genetics* 49:518-521.
- Barberger-Gateau P., Raffaitin C., Letenneur L., Berr C., Tzourio C., Dartigues J. F., Alperovitch A. (2007) Dietary patterns and risk of dementia: the Three-City cohort study. *Neurology* 69:1921-1930.
- Barrett J. C., Fry B., Maller J., Daly M. J. (2005) Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* 21:263-265.
- Bartkowska K., Turlejski K., Djavadian R. L. (2010) Neurotrophins and their receptors in early development of the mammalian nervous system. *Acta neurobiologiae experimentalis* 70:454-467.
- Beeri M. S., Rapp M., Silverman J. M., Schmeidler J., Grossman H. T., Fallon J. T., Purohit D. P., Perl D. P., Siddiqui A., Lesser G., i sur. (2006) Coronary artery disease is associated with Alzheimer disease neuropathology in APOE4 carriers. *Neurology* 66:1399-1404.
- Bertram L., McQueen M. B., Mullin K., Blacker D., Tanzi R. E. (2009) The Alzgene database. *Alzheimer Research Forum*.
- Betard C., Robitaille Y., Gee M., Tiberghien D., Larrivee D., Roy P., Mortimer J. A., Gauvreau D. (1994) Apo E allele frequencies in Alzheimer's disease, Lewy body dementia, Alzheimer's disease with cerebrovascular disease and vascular dementia. *Neuroreport* 5:1893-1896.
- Bettens K., Brouwers N., Engelborghs S., De Deyn P. P., Van Broeckhoven C., Sleegers K. (2008) SORL1 is genetically associated with increased risk for late-onset Alzheimer disease in the Belgian population. *Human mutation* 29:769-770.
- Bian J. T., Zhang J. W., Zhang Z. X., Zhao H. L. (2005) Association analysis of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene 196 A/G polymorphism with Alzheimer's disease (AD) in mainland Chinese. *Neuroscience letters* 387:11-16.
- Bibel M., Barde Y. A. (2000) Neurotrophins: key regulators of cell fate and cell shape in the vertebrate nervous system. *Genes & development* 14:2919-2937.
- Biessels G. J., Staekenborg S., Brunner E., Brayne C., Scheltens P. (2006) Risk of dementia in diabetes mellitus: a systematic review. *Lancet Neurol* 5:64-74.
- Binder D. K., Scharfman H. E. (2004) Brain-derived neurotrophic factor. *Growth factors* 22:123-131.
- Blasko I., Jellinger K., Kemmler G., Krampla W., Jungwirth S., Wichart I., Tragl K. H., Fischer P. (2008) Conversion from cognitive health to mild cognitive impairment and Alzheimer's disease: prediction by plasma amyloid beta 42, medial temporal lobe atrophy and homocysteine. *Neurobiology of aging* 29:1-11.

- Blennow K. (2004) Cerebrospinal fluid protein biomarkers for Alzheimer's disease. *NeuroRx : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* 1:213-225.
- Blennow K., Hampel H. (2003) CSF markers for incipient Alzheimer's disease. *Lancet Neurol* 2:605-613.
- Blennow K., Vanmechelen E., Hampel H. (2001) CSF total tau, Abeta42 and phosphorylated tau protein as biomarkers for Alzheimer's disease. *Molecular neurobiology* 24:87-97.
- Bodner S. M., Berrettini W., van Deerlin V., Bennett D. A., Wilson R. S., Trojanowski J. Q., Arnold S. E. (2005) Genetic variation in the brain derived neurotrophic factor gene in Alzheimer's disease. *American journal of medical genetics Part B, Neuropsychiatric genetics : the official publication of the International Society of Psychiatric Genetics* 134B:1-5.
- Bohnstedt K. C., Karlberg B., Wahlund L. O., Jonhagen M. E., Basun H., Schmidt S. (2003) Determination of isoprostanes in urine samples from Alzheimer patients using porous graphitic carbon liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of chromatography B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences* 796:11-19.
- Borroni B., Agosti C., Archetti S., Costanzi C., Bonomi S., Ghianda D., Lenzi G. L., Caimi L., Di Luca M., Padovani A. (2004) Catechol-O-methyltransferase gene polymorphism is associated with risk of psychosis in Alzheimer Disease. *Neuroscience letters* 370:127-129.
- Borroni B., Archetti S., Costanzi C., Grassi M., Ferrari M., Radeghieri A., Caimi L., Caltagirone C., Di Luca M., Padovani A., i sur. (2009a) Role of BDNF Val66Met functional polymorphism in Alzheimer's disease-related depression. *Neurobiology of aging* 30:1406-1412.
- Borroni B., Costanzi C., Padovani A. (2010) Genetic susceptibility to behavioural and psychological symptoms in Alzheimer disease. *Current Alzheimer research* 7:158-164.
- Borroni B., Di Luca M., Padovani A. (2006a) Predicting Alzheimer dementia in mild cognitive impairment patients. Are biomarkers useful? *European journal of pharmacology* 545:73-80.
- Borroni B., Grassi M., Agosti C., Archetti S., Costanzi C., Cornali C., Caltagirone C., Caimi L., Di Luca M., Padovani A. (2006b) Cumulative effect of COMT and 5-HTTLPR polymorphisms and their interaction with disease severity and comorbidities on the risk of psychosis in Alzheimer disease. *The American journal of geriatric psychiatry : official journal of the American Association for Geriatric Psychiatry* 14:343-351.
- Borroni B., Grassi M., Agosti C., Costanzi C., Archetti S., Franzoni S., Caltagirone C., Di Luca M., Caimi L., Padovani A. (2006c) Genetic correlates of behavioral endophenotypes in Alzheimer disease: role of COMT, 5-HTTLPR and APOE polymorphisms. *Neurobiology of aging* 27:1595-1603.
- Borroni B., Grassi M., Archetti S., Costanzi C., Bianchi M., Caimi L., Caltagirone C., Di Luca M., Padovani A. (2009b) BDNF genetic variations increase the risk of Alzheimer's disease-related depression. *J Alzheimers Dis* 18:867-875.
- Borroni B., Grassi M., Costanzi C., Zanetti M., Archetti S., Franzoni S., Caimi L., Padovani A. (2007) Haplotypes in catechol-O-methyltransferase gene confer increased risk for psychosis in Alzheimer disease. *Neurobiology of aging* 28:1231-1238.
- Boulle F., van den Hove D. L., Jakob S. B., Rutten B. P., Hamon M., van Os J., Lesch K. P., Lanfumey L., Steinbusch H. W., Kenis G. (2012) Epigenetic regulation of the BDNF gene: implications for psychiatric disorders. *Molecular psychiatry* 17:584-596.
- Braun A., Lommatzsch M., Mannsfeldt A., Neuhaus-Steinmetz U., Fischer A., Schnoy N., Lewin G. R., Renz H. (1999) Cellular sources of enhanced brain-derived neurotrophic factor production in a mouse model of allergic inflammation. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 21:537-546.
- Brunoni A. R., Lopes M., Fregni F. (2008) A systematic review and meta-analysis of clinical studies on major depression and BDNF levels: implications for the role of neuroplasticity in depression. *The*

- international journal of neuropsychopharmacology / official scientific journal of the Collegium Internationale Neuropsychopharmacologicum 11:1169-1180.
- Cacho J., Benito-Leon J., Garcia-Garcia R., Fernandez-Calvo B., Vicente-Villardón J. L., Mitchell A. J. (2010) Does the combination of the MMSE and clock drawing test (mini-clock) improve the detection of mild Alzheimer's disease and mild cognitive impairment? *J Alzheimers Dis* 22:889-896.
- Cao D., Lu H., Lewis T. L., Li L. (2007) Intake of sucrose-sweetened water induces insulin resistance and exacerbates memory deficits and amyloidosis in a transgenic mouse model of Alzheimer disease. *The Journal of biological chemistry* 282:36275-36282.
- Cattaneo A., Bocchio-Chiavetto L., Zanardini R., Milanese E., Placentino A., Gennarelli M. (2010) Reduced peripheral brain-derived neurotrophic factor mRNA levels are normalized by antidepressant treatment. *The international journal of neuropsychopharmacology / official scientific journal of the Collegium Internationale Neuropsychopharmacologicum* 13:103-108.
- Cavadas C., Grand D., Mosimann F., Cotrim M. D., Fontes Ribeiro C. A., Brunner H. R., Grouzmann E. (2003) Angiotensin II mediates catecholamine and neuropeptide Y secretion in human adrenal chromaffin cells through the AT1 receptor. *Regulatory peptides* 111:61-65.
- Chartier-Harlin M. C., Kachergus J., Roumier C., Mouroux V., Douay X., Lincoln S., Levecque C., Larvor L., Andrieux J., Hulihan M., i sur. (2004) Alpha-synuclein locus duplication as a cause of familial Parkinson's disease. *Lancet* 364:1167-1169.
- Chen S. L., Lee S. Y., Chang Y. H., Chen S. H., Chu C. H., Wang T. Y., Chen P. S., Lee I. H., Yang Y. K., Hong J. S., i sur. (2014) The BDNF Val66Met polymorphism and plasma brain-derived neurotrophic factor levels in Han Chinese patients with bipolar disorder and schizophrenia. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry* 51:99-104.
- Chen Z. Y., Ieraci A., Teng H., Dall H., Meng C. X., Herrera D. G., Nykjaer A., Hempstead B. L., Lee F. S. (2005) Sortilin controls intracellular sorting of brain-derived neurotrophic factor to the regulated secretory pathway. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 25:6156-6166.
- Chen Z. Y., Patel P. D., Sant G., Meng C. X., Teng K. K., Hempstead B. L., Lee F. S. (2004) Variant brain-derived neurotrophic factor (BDNF) (Met66) alters the intracellular trafficking and activity-dependent secretion of wild-type BDNF in neurosecretory cells and cortical neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 24:4401-4411.
- Chetelat G., Desgranges B., de la Sayette V., Viader F., Eustache F., Baron J. C. (2003) Mild cognitive impairment: Can FDG-PET predict who is to rapidly convert to Alzheimer's disease? *Neurology* 60:1374-1377.
- Chiang C. J., Yip P. K., Wu S. C., Lu C. S., Liou C. W., Liu H. C., Liu C. K., Chu C. H., Hwang C. S., Sung S. F., i sur. (2007) Midlife risk factors for subtypes of dementia: a nested case-control study in Taiwan. *The American journal of geriatric psychiatry : official journal of the American Association for Geriatric Psychiatry* 15:762-771.
- Chong Y. H., Shin Y. J., Lee E. O., Kaye R., Glabe C. G., Tenner A. J. (2006) ERK1/2 activation mediates Aβ oligomer-induced neurotoxicity via caspase-3 activation and tau cleavage in rat organotypic hippocampal slice cultures. *The Journal of biological chemistry* 281:20315-20325.
- Chui H. C., Victoroff J. I., Margolin D., Jagust W., Shankle R., Katzman R. (1992) Criteria for the diagnosis of ischemic vascular dementia proposed by the State of California Alzheimer's Disease Diagnostic and Treatment Centers. *Neurology* 42:473-480.
- Cockrell J. R., Folstein M. F. (1988) Mini-Mental State Examination (MMSE). *Psychopharmacol Bull* 24:689-692.

- Combarros O., Infante J., Llorca J., Berciano J. (2004) Polymorphism at codon 66 of the brain-derived neurotrophic factor gene is not associated with sporadic Alzheimer's disease. *Dementia and geriatric cognitive disorders* 18:55-58.
- Connor B., Young D., Yan Q., Faull R. L., Synek B., Dragunow M. (1997) Brain-derived neurotrophic factor is reduced in Alzheimer's disease. *Brain research Molecular brain research* 49:71-81.
- Conover W. J. (1999) *Practical nonparametric statistics*, 3rd edition. New York: John Wiley & Sons.
- Consensus recommendations for the postmortem diagnosis of Alzheimer's disease. (1997) The national institute on aging, and reagan institute working group on diagnostic criteria for the neuropathological assessment of Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging*, vol. 18 (4 Suppl):S1-S2.
- Corder E. H., Saunders A. M., Risch N. J., Strittmatter W. J., Schmechel D. E., Gaskell P. C., Jr., Rimmler J. B., Locke P. A., Conneally P. M., Schmechel K. E., et al. (1994) Protective effect of apolipoprotein E type 2 allele for late onset Alzheimer disease. *Nature genetics* 7:180-184.
- Coulson E. J., Nykjaer A. (2013) Up-regulation of sortilin mediated by amyloid-beta and p75(NTR): safety lies in the middle course. *Journal of neurochemistry* 127:149-151.
- Cousin E., Mace S., Rocher C., Dib C., Muzard G., Hannequin D., Pradier L., Deleuze J. F., Genin E., Brice A., et al. (2011) No replication of genetic association between candidate polymorphisms and Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging* 32:1443-1451.
- Cozza A., Melissari E., Iacopetti P., Mariotti V., Tedde A., Nacmias B., Conte A., Sorbi S., Pellegrini S. (2008) SNPs in neurotrophin system genes and Alzheimer's disease in an Italian population. *J Alzheimers Dis* 15:61-70.
- Craig-Schapiro R., Fagan A. M., Holtzman D. M. (2009) Biomarkers of Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis* 35:128-140.
- Craig D., Hart D. J., Carson R., Mcllroy S. P., Passmore A. P. (2004) Psychotic symptoms in Alzheimer's disease are not influenced by polymorphic variation at the dopamine receptor DRD3 gene. *Neuroscience letters* 368:33-36.
- Crowe M., Andel R., Pedersen N. L., Johansson B., Gatz M. (2003) Does participation in leisure activities lead to reduced risk of Alzheimer's disease? A prospective study of Swedish twins. *The journals of gerontology Series B, Psychological sciences and social sciences* 58:P249-255.
- Cruts M., Hendriks L., Van Broeckhoven C. (1996) The presenilin genes: a new gene family involved in Alzheimer disease pathology. *Human molecular genetics* 5 Spec No:1449-1455.
- Cummings J. L. (1997) The Neuropsychiatric Inventory: assessing psychopathology in dementia patients. *Neurology* 48:S10-16.
- Cummings J. L., Mega M., Gray K., Rosenberg-Thompson S., Carusi D. A., Gornbein J. (1994) The Neuropsychiatric Inventory: comprehensive assessment of psychopathology in dementia. *Neurology* 44:2308-2314.
- De Deyn P. P., Wirshing W. C. (2001) Scales to assess efficacy and safety of pharmacologic agents in the treatment of behavioral and psychological symptoms of dementia. *The Journal of clinical psychiatry* 62 Suppl 21:19-22.
- de la Monte S. M., Wands J. R. (2002) The AD7c-ntp neuronal thread protein biomarker for detecting Alzheimer's disease. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 7:d989-996.
- Dempster E., Touloupoulou T., McDonald C., Bramon E., Walshe M., Filbey F., Wickham H., Sham P. C., Murray R. M., Collier D. A. (2005) Association between BDNF val66 met genotype and episodic memory. *American journal of medical genetics Part B, Neuropsychiatric genetics : the official publication of the International Society of Psychiatric Genetics* 134B:73-75.

- Demuro A., Mina E., Kaye R., Milton S. C., Parker I., Glabe C. G. (2005) Calcium dysregulation and membrane disruption as a ubiquitous neurotoxic mechanism of soluble amyloid oligomers. *The Journal of biological chemistry* 280:17294-17300.
- Desai P., Nebes R., DeKosky S. T., Kambh M. I. (2005) Investigation of the effect of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) polymorphisms on the risk of late-onset Alzheimer's disease (AD) and quantitative measures of AD progression. *Neuroscience letters* 379:229-234.
- Ding Q., Dimayuga E., Keller J. N. (2006) Proteasome regulation of oxidative stress in aging and age-related diseases of the CNS. *Antioxidants & redox signaling* 8:163-172.
- Doan A., Thinakaran G., Borchelt D. R., Slunt H. H., Ratovitsky T., Podlisny M., Selkoe D. J., Seeger M., Gandy S. E., Price D. L., i sur. (1996) Protein topology of presenilin 1. *Neuron* 17:1023-1030.
- Dodson S. E., Gearing M., Lippa C. F., Montine T. J., Levey A. I., Lah J. J. (2006) LR11/SorLA expression is reduced in sporadic Alzheimer disease but not in familial Alzheimer disease. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 65:866-872.
- Dolman C. L. (1984) Diagnosis of neurometabolic disorders by examination of skin biopsies and lymphocytes. *Seminars in diagnostic pathology* 1:82-97.
- Driscoll I., Martin B., An Y., Maudsley S., Ferrucci L., Mattson M. P., Resnick S. M. (2012) Plasma BDNF is associated with age-related white matter atrophy but not with cognitive function in older, non-demented adults. *PLoS one* 7:e35217.
- Drzezga A., Grimmer T., Riemenschneider M., Lautenschlager N., Siebner H., Alexopoulos P., Minoshima S., Schwaiger M., Kurz A. (2005) Prediction of individual clinical outcome in MCI by means of genetic assessment and (18)F-FDG PET. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* 46:1625-1632.
- Dubois M. F., Hébert R. (2001) The incidence of vascular dementia in Canada: a comparison with Europe and East Asia. *Neuroepidemiology* 20:179-187.
- Dugich-Djordjevic M. M., Ohsawa F., Okazaki T., Mori N., Day J. R., Beck K. D., Hefti F. (1995) Differential regulation of catalytic and non-catalytic trkB messenger RNAs in the rat hippocampus following seizures induced by systemic administration of kainate. *Neuroscience* 66:861-877.
- Duman R. S., Heninger G. R., Nestler E. J. (1997) A molecular and cellular theory of depression. *Archives of general psychiatry* 54:597-606.
- Duman R. S., Monteggia L. M. (2006) A neurotrophic model for stress-related mood disorders. *Biological psychiatry* 59:1116-1127.
- Dunham J. S., Deakin J. F., Miyajima F., Payton A., Toro C. T. (2009) Expression of hippocampal brain-derived neurotrophic factor and its receptors in Stanley consortium brains. *Journal of psychiatric research* 43:1175-1184.
- Dunn M. J. (1992) Protein determination of total protein concentration. In: *Protein Purification Methods* (Harris, E. L. V. and Angal, S., eds) Oxford: IRL Press.
- Durany N., Michel T., Kurt J., Cruz-Sanchez F. F., Cervas-Navarro J., Riederer P. (2000) Brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 levels in Alzheimer's disease brains. *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience* 18:807-813.
- Eckman C. B., Eckman E. A. (2007) An update on the amyloid hypothesis. *Neurologic clinics* 25:669-682, vi.
- Egan M. F., Kojima M., Callicott J. H., Goldberg T. E., Kolachana B. S., Bertolino A., Zaitsev E., Gold B., Goldman D., Dean M., i sur. (2003) The BDNF val66met polymorphism affects activity-dependent secretion of BDNF and human memory and hippocampal function. *Cell* 112:257-269.

- Elfving B., Plougmann P. H., Wegener G. (2010) Detection of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in rat blood and brain preparations using ELISA: pitfalls and solutions. *Journal of neuroscience methods* 187:73-77.
- Elliott E., Atlas R., Lange A., Ginzburg I. (2005) Brain-derived neurotrophic factor induces a rapid dephosphorylation of tau protein through a PI-3 Kinase signalling mechanism. *The European journal of neuroscience* 22:1081-1089.
- Erickson K. I., Prakash R. S., Voss M. W., Chaddock L., Heo S., McLaren M., Pence B. D., Martin S. A., Vieira V. J., Woods J. A., i sur. (2010) Brain-derived neurotrophic factor is associated with age-related decline in hippocampal volume. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30:5368-5375.
- Esiri M. M., Nagy Z., Smith M. Z., Barnettson L., Smith A. D. (1999) Cerebrovascular disease and threshold for dementia in the early stages of Alzheimer's disease. *Lancet* 354:919-920.
- Fagan A. M., Mintun M. A., Mach R. H., Lee S. Y., Dence C. S., Shah A. R., LaRossa G. N., Spinner M. L., Klunk W. E., Mathis C. A., i sur. (2006) Inverse relation between in vivo amyloid imaging load and cerebrospinal fluid Abeta42 in humans. *Annals of neurology* 59:512-519.
- Fahnestock M. (2011) Brain-derived neurotrophic factor: The link between amyloid-b and memory loss. *Future Neurology* 6:13.
- Fahnestock M., Garzon D., Holsinger R. M., Michalski B. (2002) Neurotrophic factors and Alzheimer's disease: are we focusing on the wrong molecule? *Journal of neural transmission Supplementum* 241-252.
- Farrer L. A., Cupples L. A., Haines J. L., Hyman B., Kukull W. A., Mayeux R., Myers R. H., Pericak-Vance M. A., Risch N., van Duijn C. M. (1997) Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease. A meta-analysis. APOE and Alzheimer Disease Meta Analysis Consortium. *Jama* 278:1349-1356.
- Faul F., Erdfelder E., Lang A. G., Buchner A. (2007) G*Power 3: a flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. *Behavior research methods* 39:175-191.
- Feher A., Juhasz A., Rimanoczy A., Kalman J., Janka Z. (2009) Association between BDNF Val66Met polymorphism and Alzheimer disease, dementia with Lewy bodies, and Pick disease. *Alzheimer disease and associated disorders* 23:224-228.
- Ferrer I., Marin C., Rey M. J., Ribalta T. (2000) Brain-derived neurotrophic factor in patients with frontotemporal dementia. *Neuroscience letters* 279:33-36.
- Ferrer I., Marin C., Rey M. J., Ribalta T., Goutan E., Blanco R., Tolosa E., Marti E. (1999) BDNF and full-length and truncated TrkB expression in Alzheimer disease. Implications in therapeutic strategies. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 58:729-739.
- Fewlass D. C., Noboa K., Pi-Sunyer F. X., Johnston J. M., Yan S. D., Tezapsidis N. (2004) Obesity-related leptin regulates Alzheimer's Abeta. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 18:1870-1878.
- Findeis M. A. (2007) The role of amyloid beta peptide 42 in Alzheimer's disease. *Pharmacology & therapeutics* 116:266-286.
- Fitzpatrick A. L., Kuller L. H., Lopez O. L., Diehr P., O'Meara E. S., Longstreth W. T., Jr., Luchsinger J. A. (2009) Midlife and late-life obesity and the risk of dementia: cardiovascular health study. *Archives of neurology* 66:336-342.
- Flirski M., Sobow T. (2005) Biochemical markers and risk factors of Alzheimer's disease. *Current Alzheimer research* 2:47-64.

- Folstein M. F., Folstein S. E., McHugh P. R. (1975) "Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *Journal of psychiatric research* 12:189-198.
- Forero D. A., Benitez B., Arboleda G., Yunis J. J., Pardo R., Arboleda H. (2006a) Analysis of functional polymorphisms in three synaptic plasticity-related genes (BDNF, COMT AND UCHL1) in Alzheimer's disease in Colombia. *Neuroscience research* 55:334-341.
- Forero D. A., Casadesus G., Perry G., Arboleda H. (2006b) Synaptic dysfunction and oxidative stress in Alzheimer's disease: emerging mechanisms. *Journal of cellular and molecular medicine* 10:796-805.
- Formichi P., Battisti C., Radi E., Federico A. (2006) Cerebrospinal fluid tau, A beta, and phosphorylated tau protein for the diagnosis of Alzheimer's disease. *Journal of cellular physiology* 208:39-46.
- Fratiglioni L., Ahlbom A., Viitanen M., Winblad B. (1993) Risk factors for late-onset Alzheimer's disease: a population-based, case-control study. *Annals of neurology* 33:258-266.
- Fratiglioni L., Launer L. J., Andersen K., Breteler M. M., Copeland J. R., Dartigues J. F., Lobo A., Martinez-Lage J., Soininen H., Hofman A. (2000) Incidence of dementia and major subtypes in Europe: A collaborative study of population-based cohorts. *Neurologic Diseases in the Elderly Research Group. Neurology* 54:S10-15.
- Freeman S. H., Raju S., Hyman B. T., Frosch M. P., Irizarry M. C. (2007) Plasma A beta levels do not reflect brain A beta levels. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 66:264-271.
- Fujimura H., Altar C. A., Chen R., Nakamura T., Nakahashi T., Kambayashi J., Sun B., Tandon N. N. (2002) Brain-derived neurotrophic factor is stored in human platelets and released by agonist stimulation. *Thrombosis and haemostasis* 87:728-734.
- Fukumoto N., Fujii T., Combarros O., Kamboh M. I., Tsai S. J., Matsushita S., Nacmias B., Comings D. E., Arboleda H., Ingelsson M., i sur. (2010) Sexually dimorphic effect of the Val66Met polymorphism of BDNF on susceptibility to Alzheimer's disease: New data and meta-analysis. *American journal of medical genetics Part B, Neuropsychiatric genetics : the official publication of the International Society of Psychiatric Genetics* 153B:235-242.
- Gao Y., Huang C., Zhao K., Ma L., Qiu X., Zhang L., Xiu Y., Chen L., Lu W., Huang C., i sur. (2013) Depression as a risk factor for dementia and mild cognitive impairment: a meta-analysis of longitudinal studies. *Int J Geriatr Psychiatry* 28:441-449.
- Garzon D., Yu G., Fahnstock M. (2002) A new brain-derived neurotrophic factor transcript and decrease in brain-derived neurotrophic factor transcripts 1, 2 and 3 in Alzheimer's disease parietal cortex. *Journal of neurochemistry* 82:1058-1064.
- Gasparini L., Racchi M., Binetti G., Trabucchi M., Solerte S. B., Alkon D., Etcheberrigaray R., Gibson G., Blass J., Paoletti R., i sur. (1998) Peripheral markers in testing pathophysiological hypotheses and diagnosing Alzheimer's disease. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 12:17-34.
- Gauthier S., Reisberg B., Zaudig M., Petersen R. C., Ritchie K., Broich K., Belleville S., Brodaty H., Bennett D., Chertkow H., i sur. (2006) Mild cognitive impairment. *Lancet* 367:1262-1270.
- Ghosh A., Carnahan J., Greenberg M. E. (1994) Requirement for BDNF in activity-dependent survival of cortical neurons. *Science* 263:1618-1623.
- Giedraitis V., Kilander L., Degerman-Gunnarsson M., Sundelof J., Axelsson T., Syvanen A. C., Lannfelt L., Glaser A. (2009) Genetic analysis of Alzheimer's disease in the Uppsala Longitudinal Study of Adult Men. *Dementia and geriatric cognitive disorders* 27:59-68.
- Gielen A., Khademi M., Muhallab S., Olsson T., Piehl F. (2003) Increased brain-derived neurotrophic factor expression in white blood cells of relapsing-remitting multiple sclerosis patients. *Scandinavian journal of immunology* 57:493-497.

- Giese M., Unternahrer E., Huttig H., Beck J., Brand S., Calabrese P., Holsboer-Trachsler E., Eckert A. (2014) BDNF: an indicator of insomnia? *Molecular psychiatry* 19:151-152.
- Goate A., Chartier-Harlin M. C., Mullan M., Brown J., Crawford F., Fidani L., Giuffra L., Haynes A., Irving N., James L., i sur. (1991) Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature* 349:704-706.
- GomezIsla T., West H. L., Rebeck G. W., Harr S. D., Growdon J. H., Locascio J. J., Perls T. T., Lipsitz L. A., Hyman B. T. (1996) Clinical and pathological correlates of apolipoprotein E epsilon 4 in Alzheimer's disease. *Annals of neurology* 39:62-70.
- Gotz R., Koster R., Winkler C., Raulf F., Lottspeich F., Scharl M., Thoenen H. (1994) Neurotrophin-6 is a new member of the nerve growth factor family. *Nature* 372:266-269.
- Graff-Radford N. R., Crook J. E., Lucas J., Boeve B. F., Knopman D. S., Ivnik R. J., Smith G. E., Younkin L. H., Petersen R. C., Younkin S. G. (2007) Association of low plasma A β 42/A β 40 ratios with increased imminent risk for mild cognitive impairment and Alzheimer disease. *Archives of neurology* 64:354-362.
- Grant W. B., Campbell A., Itzhaki R. F., Savory J. (2002) The significance of environmental factors in the etiology of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 4:179-189.
- Grehan S., Tse E., Taylor J. M. (2001) Two distal downstream enhancers direct expression of the human apolipoprotein E gene to astrocytes in the brain. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 21:812-822.
- Grover L. M., Teyler T. J. (1990) Two components of long-term potentiation induced by different patterns of afferent activation. *Nature* 347:477-479.
- Grunblatt E., Zehetmayer S., Bartl J., Loffler C., Wichart I., Rainer M. K., Jungwirth S., Bauer P., Danielczyk W., Tragl K. H., i sur. (2009) Genetic risk factors and markers for Alzheimer's disease and/or depression in the VITA study. *Journal of psychiatric research* 43:298-308.
- Gunstad J., Benitez A., Smith J., Glickman E., Spitznagel M. B., Alexander T., Juvancic-Heltzel J., Murray L. (2008) Serum brain-derived neurotrophic factor is associated with cognitive function in healthy older adults. *Journal of geriatric psychiatry and neurology* 21:166-170.
- Gustafsen C., Glerup S., Pallesen L. T., Olsen D., Andersen O. M., Nykjaer A., Madsen P., Petersen C. M. (2013) Sortilin and SorLA display distinct roles in processing and trafficking of amyloid precursor protein. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 33:64-71.
- Gustafson D. R., Backman K., Waern M., Ostling S., Guo X., Zandi P., Mielke M. M., Bengtsson C., Skoog I. (2009) Adiposity indicators and dementia over 32 years in Sweden. *Neurology* 73:1559-1566.
- Haag M. D., Hofman A., Koudstaal P. J., Stricker B. H., Breteler M. M. (2009) Statins are associated with a reduced risk of Alzheimer disease regardless of lipophilicity. *The Rotterdam Study. Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 80:13-17.
- Hahn W. H., Suh J. S., Cho B. S. (2011) Linkage and association study of neurotrophins and their receptors as novel susceptibility genes for childhood IgA nephropathy. *Pediatric research* 69:299-305.
- Hall J., Thomas K. L., Everitt B. J. (2000) Rapid and selective induction of BDNF expression in the hippocampus during contextual learning. *Nature neuroscience* 3:533-535.
- Hampel H., Buerger K., Zinkowski R., Teipel S. J., Goernitz A., Andreasen N., Sjoegren M., DeBernardis J., Kerkman D., Ishiguro K., i sur. (2004) Measurement of phosphorylated tau epitopes in the differential diagnosis of Alzheimer disease: a comparative cerebrospinal fluid study. *Archives of general psychiatry* 61:95-102.

- Hansson O., Zetterberg H., Buchhave P., Andreasson U., Londos E., Minthon L., Blennow K. (2007) Prediction of Alzheimer's disease using the CSF Aβ₄₂/Aβ₄₀ ratio in patients with mild cognitive impairment. *Dementia and geriatric cognitive disorders* 23:316-320.
- Hansson O., Zetterberg H., Buchhave P., Londos E., Blennow K., Minthon L. (2006) Association between CSF biomarkers and incipient Alzheimer's disease in patients with mild cognitive impairment: a follow-up study. *Lancet Neurol* 5:228-234.
- Hardy J. (2009) The amyloid hypothesis for Alzheimer's disease: a critical reappraisal. *Journal of neurochemistry* 110:1129-1134.
- Hardy J. A., Higgins G. A. (1992) Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* 256:184-185.
- Hariri A. R., Goldberg T. E., Mattay V. S., Kolachana B. S., Callicott J. H., Egan M. F., Weinberger D. R. (2003) Brain-derived neurotrophic factor val66met polymorphism affects human memory-related hippocampal activity and predicts memory performance. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 23:6690-6694.
- Hart D. J., Craig D., Compton S. A., Critchlow S., Kerrigan B. M., McIlroy S. P., Passmore A. P. (2003) A retrospective study of the behavioural and psychological symptoms of mid and late phase Alzheimer's disease. *Int J Geriatr Psychiatry* 18:1037-1042.
- He X. M., Zhang Z. X., Zhang J. W., Zhou Y. T., Tang M. N., Wu C. B., Hong Z. (2007) Lack of association between the BDNF gene Val66Met polymorphism and Alzheimer disease in a Chinese Han population. *Neuropsychobiology* 55:151-155.
- Hendriks L., van Duijn C. M., Cras P., Cruts M., Van Hul W., van Harskamp F., Warren A., McInnis M. G., Antonarakis S. E., Martin J. J., i sur. (1992) Presenile dementia and cerebral haemorrhage linked to a mutation at codon 692 of the beta-amyloid precursor protein gene. *Nature genetics* 1:218-221.
- Herrmann N., Lanctot K. L., Khan L. R. (2004) The role of norepinephrine in the behavioral and psychological symptoms of dementia. *The Journal of neuropsychiatry and clinical neurosciences* 16:261-276.
- Hersch E. C., Falzgraf S. (2007) Management of the behavioral and psychological symptoms of dementia. *Clinical interventions in aging* 2:611-621.
- Ho L., Qin W., Pompl P. N., Xiang Z., Wang J., Zhao Z., Peng Y., Cambareri G., Rocher A., Mobbs C. V., i sur. (2004) Diet-induced insulin resistance promotes amyloidosis in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 18:902-904.
- Hock C. H., Heese K., Olivieri G., Hulette C. H., Rosenberg C., Nitsch R. M., Otten U. (2000) Alterations in neurotrophins and neurotrophin receptors in Alzheimer's disease. *Journal of neural transmission Supplementum* 59:171-174.
- Holmes C., Arranz M., Collier D., Powell J., Lovestone S. (2003) Depression in Alzheimer's disease: the effect of serotonin receptor gene variation. *American journal of medical genetics Part B, Neuropsychiatric genetics : the official publication of the International Society of Psychiatric Genetics* 119B:40-43.
- Holmes C., Smith H., Ganderton R., Arranz M., Collier D., Powell J., Lovestone S. (2001) Psychosis and aggression in Alzheimer's disease: the effect of dopamine receptor gene variation. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 71:777-779.
- Holsinger R. M., Schnarr J., Henry P., Castelo V. T., Fahnestock M. (2000) Quantitation of BDNF mRNA in human parietal cortex by competitive reverse transcription-polymerase chain reaction: decreased levels in Alzheimer's disease. *Brain research Molecular brain research* 76:347-354.

- Holtzman D. M., Pitas R. E., Kilbridge J., Nathan B., Mahley R. W., Bu G., Schwartz A. L. (1995) Low density lipoprotein receptor-related protein mediates apolipoprotein E-dependent neurite outgrowth in a central nervous system-derived neuronal cell line. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92:9480-9484.
- Honea R. A., Cruchaga C., Perea R. D., Saykin A. J., Burns J. M., Weinberger D. R., Goate A. M., Alzheimer's Disease Neuroimaging I. (2013) Characterizing the role of brain derived neurotrophic factor genetic variation in Alzheimer's disease neurodegeneration. *PLoS one* 8:e76001.
- Hu X., Ballo L., Pietila L., Viesselmann C., Ballweg J., Lumbard D., Stevenson M., Merriam E., Dent E. W. (2011) BDNF-induced increase of PSD-95 in dendritic spines requires dynamic microtubule invasions. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 31:15597-15603.
- Huang E. J., Reichardt L. F. (2003) Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annual review of biochemistry* 72:609-642.
- Huang R., Huang J., Cathcart H., Smith S., Poduslo S. E. (2007) Genetic variants in brain-derived neurotrophic factor associated with Alzheimer's disease. *Journal of medical genetics* 44:e66.
- Humpel C. (2011) Identifying and validating biomarkers for Alzheimer's disease. *Trends in biotechnology* 29:26-32.
- Humpel C., Hochstrasser T. (2011) Cerebrospinal fluid and blood biomarkers in Alzheimer's disease. *World journal of psychiatry* 1:8-18.
- Hutchinson A. D., Mathias J. L. (2007) Neuropsychological deficits in frontotemporal dementia and Alzheimer's disease: a meta-analytic review. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 78:917-928.
- Hye A., Lynham S., Thambisetty M., Causevic M., Campbell J., Byers H. L., Hooper C., Rijdsdijk F., Tabrizi S. J., Banner S., i sur. (2006) Proteome-based plasma biomarkers for Alzheimer's disease. *Brain* 129:3042-3050.
- Ihl R., Brinkmeyer J., Janner M., Kerdar M. S. (2000) A comparison of ADAS and EEG in the discrimination of patients with dementia of the Alzheimer type from healthy controls. *Neuropsychobiology* 41:102-107.
- Ikeda M., Brown J., Holland A. J., Fukuhara R., Hodges J. R. (2002) Changes in appetite, food preference, and eating habits in frontotemporal dementia and Alzheimer's disease. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 73:371-376.
- Imamura K., Hishikawa N., Ono K., Suzuki H., Sawada M., Nagatsu T., Yoshida M., Hashizume Y. (2005) Cytokine production of activated microglia and decrease in neurotrophic factors of neurons in the hippocampus of Lewy body disease brains. *Acta neuropathologica* 109:141-150.
- Irizarry M. C. (2004) Biomarkers of Alzheimer disease in plasma. *NeuroRx : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* 1:226-234.
- Itoh K., Hashimoto K., Shimizu E., Sekine Y., Ozaki N., Inada T., Harano M., Iwata N., Komiyama T., Yamada M., i sur. (2005) Association study between brain-derived neurotrophic factor gene polymorphisms and methamphetamine abusers in Japan. *American journal of medical genetics Part B, Neuropsychiatric genetics : the official publication of the International Society of Psychiatric Genetics* 132B:70-73.
- Jack C. R., Jr., Albert M. S., Knopman D. S., McKhann G. M., Sperling R. A., Carrillo M. C., Thies B., Phelps C. H. (2011) Introduction to the recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association* 7:257-262.

- Jack C. R., Jr., Weigand S. D., Shiung M. M., Przybelski S. A., O'Brien P. C., Gunter J. L., Knopman D. S., Boeve B. F., Smith G. E., Petersen R. C. (2008) Atrophy rates accelerate in amnesic mild cognitive impairment. *Neurology* 70:1740-1752.
- Jiang H., Wang R., Liu Y., Zhang Y., Chen Z. Y. (2009) BDNF Val66Met polymorphism is associated with unstable angina. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 400:3-7.
- Jick H., Zornberg G. L., Jick S. S., Seshadri S., Drachman D. A. (2000) Statins and the risk of dementia. *Lancet* 356:1627-1631.
- Ju Y. E., McLeland J. S., Toedebusch C. D., Xiong C., Fagan A. M., Duntley S. P., Morris J. C., Holtzman D. M. (2013) Sleep quality and preclinical Alzheimer disease. *JAMA neurology* 70:587-593.
- Julien C., Tremblay C., Phivilay A., Berthiaume L., Emond V., Julien P., Calon F. (2010) High-fat diet aggravates amyloid-beta and tau pathologies in the 3xTg-AD mouse model. *Neurobiology of aging* 31:1516-1531.
- Karege F., Bondolfi G., Gervasoni N., Schwald M., Aubry J. M., Bertschy G. (2005) Low brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels in serum of depressed patients probably results from lowered platelet BDNF release unrelated to platelet reactivity. *Biological psychiatry* 57:1068-1072.
- Karege F., Schwald M., Cisse M. (2002) Postnatal developmental profile of brain-derived neurotrophic factor in rat brain and platelets. *Neuroscience letters* 328:261-264.
- Kawamoto Y., Nakamura S., Nakano S., Oka N., Akiguchi I., Kimura J. (1996) Immunohistochemical localization of brain-derived neurotrophic factor in adult rat brain. *Neuroscience* 74:1209-1226.
- Kernie S. G., Liebl D. J., Parada L. F. (2000) BDNF regulates eating behavior and locomotor activity in mice. *The EMBO journal* 19:1290-1300.
- Kerschensteiner M., Gallmeier E., Behrens L., Leal V. V., Misgeld T., Klinkert W. E., Kolbeck R., Hoppe E., Oropeza-Wekerle R. L., Bartke I., et al. (1999) Activated human T cells, B cells, and monocytes produce brain-derived neurotrophic factor in vitro and in inflammatory brain lesions: a neuroprotective role of inflammation? *The Journal of experimental medicine* 189:865-870.
- Kesslak J. P., So V., Choi J., Cotman C. W., Gomez-Pinilla F. (1998) Learning upregulates brain-derived neurotrophic factor messenger ribonucleic acid: a mechanism to facilitate encoding and circuit maintenance? *Behavioral neuroscience* 112:1012-1019.
- Khachaturian A. S., Zandi P. P., Lyketsos C. G., Hayden K. M., Skoog I., Norton M. C., Tschanz J. T., Mayer L. S., Welsh-Bohmer K. A., Breitner J. C. (2006) Antihypertensive medication use and incident Alzheimer disease: the Cache County Study. *Archives of neurology* 63:686-692.
- Kimchi-Sarfaty C., Oh J. M., Kim I. W., Sauna Z. E., Calcagno A. M., Ambudkar S. V., Gottesman M. M. (2007) A "silent" polymorphism in the MDR1 gene changes substrate specificity. *Science* 315:525-528.
- Kivipelto M., Laakso M. P., Tuomilehto J., Nissinen A., Soininen H. (2002) Hypertension and hypercholesterolaemia as risk factors for Alzheimer's disease: potential for pharmacological intervention. *CNS drugs* 16:435-444.
- Kivipelto M., Ngandu T., Fratiglioni L., Viitanen M., Kareholt I., Winblad B., Helkala E. L., Tuomilehto J., Soininen H., Nissinen A. (2005a) Obesity and vascular risk factors at midlife and the risk of dementia and Alzheimer disease. *Archives of neurology* 62:1556-1560.
- Kivipelto M., Solomon A., Winblad B. (2005b) Statin therapy in Alzheimer's disease. *Lancet Neurol* 4:521-522.
- Klafki H. W., Staufenbiel M., Kornhuber J., Wiltfang J. (2006) Therapeutic approaches to Alzheimer's disease. *Brain* 129:2840-2855.
- Klann E., Dever T. E. (2004) Biochemical mechanisms for translational regulation in synaptic plasticity. *Nature reviews Neuroscience* 5:931-942.

- Klein A. B., Jennum P., Knudsen S., Gammeltoft S., Mikkelsen J. D. (2013) Increased serum brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels in patients with narcolepsy. *Neuroscience letters* 544:31-35.
- Knipper M., da Penha Berzaghi M., Blochl A., Breer H., Thoenen H., Lindholm D. (1994) Positive feedback between acetylcholine and the neurotrophins nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor in the rat hippocampus. *The European journal of neuroscience* 6:668-671.
- Knopman D. S., Boeve B. F., Petersen R. C. (2003) Essentials of the proper diagnoses of mild cognitive impairment, dementia, and major subtypes of dementia. *Mayo Clinic proceedings* 78:1290-1308.
- Knopman D. S., DeKosky S. T., Cummings J. L., Chui H., Corey-Bloom J., Relkin N., Small G. W., Miller B., Stevens J. C. (2001) Practice parameter: diagnosis of dementia (an evidence-based review). Report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology* 56:1143-1153.
- Knusel B., Winslow J. W., Rosenthal A., Burton L. E., Seid D. P., Nikolics K., Hefti F. (1991) Promotion of central cholinergic and dopaminergic neuron differentiation by brain-derived neurotrophic factor but not neurotrophin 3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88:961-965.
- Kohara K., Kitamura A., Morishima M., Tsumoto T. (2001) Activity-dependent transfer of brain-derived neurotrophic factor to postsynaptic neurons. *Science* 291:2419-2423.
- Kohno R., Sawada H., Kawamoto Y., Uemura K., Shibasaki H., Shimohama S. (2004) BDNF is induced by wild-type alpha-synuclein but not by the two mutants, A30P or A53T, in glioma cell line. *Biochemical and biophysical research communications* 318:113-118.
- Kojima M., Takei N., Numakawa T., Ishikawa Y., Suzuki S., Matsumoto T., Katoh-Semba R., Nawa H., Hatanaka H. (2001) Biological characterization and optical imaging of brain-derived neurotrophic factor-green fluorescent protein suggest an activity-dependent local release of brain-derived neurotrophic factor in neurites of cultured hippocampal neurons. *Journal of neuroscience research* 64:1-10.
- Komar A. A. (2007) Silent SNPs: impact on gene function and phenotype. *Pharmacogenomics* 8:1075-1080.
- Komulainen P., Pedersen M., Hanninen T., Bruunsgaard H., Lakka T. A., Kivipelto M., Hassinen M., Rauramaa T. H., Pedersen B. K., Rauramaa R. (2008) BDNF is a novel marker of cognitive function in ageing women: the DR's EXTRA Study. *Neurobiology of learning and memory* 90:596-603.
- Kovacs D. M., Fausett H. J., Page K. J., Kim T. W., Moir R. D., Merriam D. E., Hollister R. D., Hallmark O. G., Mancini R., Felsenstein K. M., et al. (1996) Alzheimer-associated presenilins 1 and 2: neuronal expression in brain and localization to intracellular membranes in mammalian cells. *Nature medicine* 2:224-229.
- Kozman M. N., Wattis J., Curran S. (2006) Pharmacological management of behavioural and psychological disturbance in dementia. *Human psychopharmacology* 21:1-12.
- Kroner Z. (2009) The relationship between Alzheimer's disease and diabetes: Type 3 diabetes? *Alternative medicine review : a journal of clinical therapeutic* 14:373-379.
- Kunugi H., Ueki A., Otsuka M., Isse K., Hirasawa H., Kato N., Nabika T., Kobayashi S., Nanko S. (2001) A novel polymorphism of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene associated with late-onset Alzheimer's disease. *Molecular psychiatry* 6:83-86.
- Laitinen M. H., Ngandu T., Rovio S., Helkala E. L., Uusitalo U., Viitanen M., Nissinen A., Tuomilehto J., Soininen H., Kivipelto M. (2006) Fat intake at midlife and risk of dementia and Alzheimer's disease: a population-based study. *Dementia and geriatric cognitive disorders* 22:99-107.
- Lam L. C., Tang N. L., Ma S. L., Zhang W., Chiu H. F. (2004) 5-HT2A T102C receptor polymorphism and neuropsychiatric symptoms in Alzheimer's disease. *Int J Geriatr Psychiatry* 19:523-526.

- Lanctot K. L., Herrmann N., Mazzotta P. (2001) Role of serotonin in the behavioral and psychological symptoms of dementia. *The Journal of neuropsychiatry and clinical neurosciences* 13:5-21.
- Lanctot K. L., Herrmann N., Mazzotta P., Khan L. R., Ingber N. (2004) GABAergic function in Alzheimer's disease: evidence for dysfunction and potential as a therapeutic target for the treatment of behavioural and psychological symptoms of dementia. *Canadian journal of psychiatry Revue canadienne de psychiatrie* 49:439-453.
- Landau S. M., Harvey D., Madison C. M., Reiman E. M., Foster N. L., Aisen P. S., Petersen R. C., Shaw L. M., Trojanowski J. Q., Jack C. R., Jr., i sur. (2010) Comparing predictors of conversion and decline in mild cognitive impairment. *Neurology* 75:230-238.
- Lang U. E., Hellweg R., Gallinat J. (2004) BDNF serum concentrations in healthy volunteers are associated with depression-related personality traits. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 29:795-798.
- Lang U. E., Hellweg R., Sander T., Gallinat J. (2009) The Met allele of the BDNF Val66Met polymorphism is associated with increased BDNF serum concentrations. *Molecular psychiatry* 14:120-122.
- Lapchak P. A., Hefti F. (1992) BDNF and NGF treatment in lesioned rats: effects on cholinergic function and weight gain. *Neuroreport* 3:405-408.
- Larson E. B., Wang L., Bowen J. D., McCormick W. C., Teri L., Crane P., Kukull W. (2006) Exercise is associated with reduced risk for incident dementia among persons 65 years of age and older. *Annals of internal medicine* 144:73-81.
- Laske C., Stellos K., Hoffmann N., Stransky E., Straten G., Eschweiler G. W., Leyhe T. (2011) Higher BDNF serum levels predict slower cognitive decline in Alzheimer's disease patients. *The international journal of neuropsychopharmacology / official scientific journal of the Collegium Internationale Neuropsychopharmacologicum* 14:399-404.
- Laske C., Stransky E., Leyhe T., Eschweiler G. W., Maetzler W., Wittorf A., Soekadar S., Richartz E., Koehler N., Bartels M., i sur. (2007) BDNF serum and CSF concentrations in Alzheimer's disease, normal pressure hydrocephalus and healthy controls. *Journal of psychiatric research* 41:387-394.
- Laske C., Stransky E., Leyhe T., Eschweiler G. W., Wittorf A., Richartz E., Bartels M., Buchkremer G., Schott K. (2006) Stage-dependent BDNF serum concentrations in Alzheimer's disease. *Journal of neural transmission* 113:1217-1224.
- Lau L. F., Schachter J. B., Seymour P. A., Sanner M. A. (2002) Tau protein phosphorylation as a therapeutic target in Alzheimer's disease. *Current topics in medicinal chemistry* 2:395-415.
- Launer L. J., Ross G. W., Petrovitch H., Masaki K., Foley D., White L. R., Havlik R. J. (2000) Midlife blood pressure and dementia: the Honolulu-Asia aging study. *Neurobiology of aging* 21:49-55.
- Lee A. Y. (2011) Vascular dementia. *Chonnam medical journal* 47:66-71.
- Lee B. H., Kim Y. K. (2010) The roles of BDNF in the pathophysiology of major depression and in antidepressant treatment. *Psychiatry investigation* 7:231-235.
- Lee H., Swanwick G. R., Coen R. F., Lawlor B. A. (1996) Use of the clock drawing task in the diagnosis of mild and very mild Alzheimer's disease. *International psychogeriatrics / IPA* 8:469-476.
- Lee J., Fukumoto H., Orne J., Klucken J., Raju S., Vanderburg C. R., Irizarry M. C., Hyman B. T., Ingelsson M. (2005) Decreased levels of BDNF protein in Alzheimer temporal cortex are independent of BDNF polymorphisms. *Experimental neurology* 194:91-96.
- Lee J. H., Cheng R., Schupf N., Manly J., Lantigua R., Stern Y., Rogava E., Wakutani Y., Farrer L., St George-Hyslop P., i sur. (2007) The association between genetic variants in SORL1 and Alzheimer disease in an urban, multiethnic, community-based cohort. *Archives of neurology* 64:501-506.

- Lee J. M., Blennow K., Andreasen N., Laterza O., Modur V., Olander J., Gao F., Ohlendorf M., Ladenson J. H. (2008) The brain injury biomarker VLP-1 is increased in the cerebrospinal fluid of Alzheimer disease patients. *Clinical chemistry* 54:1617-1623.
- Lesne S., Koh M. T., Kotilinek L., Kaye R., Glabe C. G., Yang A., Gallagher M., Ashe K. H. (2006) A specific amyloid-beta protein assembly in the brain impairs memory. *Nature* 440:352-357.
- Lessmann V., Gottmann K., Malscangio M. (2003) Neurotrophin secretion: current facts and future prospects. *Progress in neurobiology* 69:341-374.
- Leverenz J. B., McKeith I. G. (2002) Dementia with Lewy bodies. *The Medical clinics of North America* 86:519-535.
- Levin-Allerhand J. A., Lominska C. E., Smith J. D. (2002) Increased amyloid- levels in APPSWE transgenic mice treated chronically with a physiological high-fat high-cholesterol diet. *The journal of nutrition, health & aging* 6:315-319.
- Levy S., McConville M., Lazaro G. A., Averbach P. (2007) Competitive ELISA studies of neural thread protein in urine in Alzheimer's disease. *Journal of clinical laboratory analysis* 21:24-33.
- Li G., Peskind E. R., Millard S. P., Chi P., Sokal I., Yu C. E., Bekris L. M., Raskind M. A., Galasko D. R., Montine T. J. (2009) Cerebrospinal fluid concentration of brain-derived neurotrophic factor and cognitive function in non-demented subjects. *PLoS one* 4:e5424.
- Li H., Wetten S., Li L., St Jean P. L., Upmanyu R., Surh L., Hosford D., Barnes M. R., Briley J. D., Borrie M., i sur. (2008) Candidate single-nucleotide polymorphisms from a genomewide association study of Alzheimer disease. *Archives of neurology* 65:45-53.
- Li J., Wang Y. J., Zhang M., Xu Z. Q., Gao C. Y., Fang C. Q., Yan J. C., Zhou H. D., Chongqing Ageing Study G. (2011) Vascular risk factors promote conversion from mild cognitive impairment to Alzheimer disease. *Neurology* 76:1485-1491.
- Li Y., Rowland C., Tacey K., Catanese J., Sninsky J., Hardy J., Powell J., Lovestone S., Morris J. C., Thal L., i sur. (2005) The BDNF Val66Met polymorphism is not associated with late onset Alzheimer's disease in three case-control samples. *Molecular psychiatry* 10:809-810.
- Lieberman J., Schlessner L., Tachiki K. H., Kling A. S. (1995) Serum alpha 1-antichymotrypsin level as a marker for Alzheimer-type dementia. *Neurobiology of aging* 16:747-753.
- Lim Y. Y., Villemagne V. L., Laws S. M., Ames D., Pietrzak R. H., Ellis K. A., Harrington K., Bourgeat P., Bush A. I., Martins R. N., i sur. (2014) Effect of BDNF Val66Met on memory decline and hippocampal atrophy in prodromal Alzheimer's disease: a preliminary study. *PLoS one* 9:e86498.
- Lim Y. Y., Villemagne V. L., Laws S. M., Ames D., Pietrzak R. H., Ellis K. A., Harrington K. D., Bourgeat P., Salvado O., Darby D., i sur. (2013) BDNF Val66Met, Abeta amyloid, and cognitive decline in preclinical Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging* 34:2457-2464.
- Lindholm D., Carroll P., Tzimagiorgis G., Thoenen H. (1996) Autocrine-paracrine regulation of hippocampal neuron survival by IGF-1 and the neurotrophins BDNF, NT-3 and NT-4. *The European journal of neuroscience* 8:1452-1460.
- Liu L., Foroud T., Xuei X., Berrettini W., Byerley W., Coryell W., El-Mallakh R., Gershon E. S., Kelsoe J. R., Lawson W. B., i sur. (2008) Evidence of association between brain-derived neurotrophic factor gene and bipolar disorder. *Psychiatric genetics* 18:267-274.
- Livak K. J., Schmittgen T. D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25:402-408.
- Loh N. K., Woerly S., Bunt S. M., Wilton S. D., Harvey A. R. (2001) The regrowth of axons within tissue defects in the CNS is promoted by implanted hydrogel matrices that contain BDNF and CNTF producing fibroblasts. *Experimental neurology* 170:72-84.

- Lommatzsch M., Zingler D., Schuhbaeck K., Schloetcke K., Zingler C., Schuff-Werner P., Virchow J. C. (2005) The impact of age, weight and gender on BDNF levels in human platelets and plasma. *Neurobiology of aging* 26:115-123.
- Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of biological chemistry* 193:265-275.
- Lu B., Nagappan G., Guan X., Nathan P. J., Wren P. (2013) BDNF-based synaptic repair as a disease-modifying strategy for neurodegenerative diseases. *Nature reviews Neuroscience* 14:401-416.
- Lyons W. E., Mamounas L. A., Ricaurte G. A., Coppola V., Reid S. W., Bora S. H., Wihler C., Koliatsos V. E., Tessarollo L. (1999) Brain-derived neurotrophic factor-deficient mice develop aggressiveness and hyperphagia in conjunction with brain serotonergic abnormalities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96:15239-15244.
- Maddalena A., Papassotiropoulos A., Muller-Tillmanns B., Jung H. H., Hegi T., Nitsch R. M., Hock C. (2003) Biochemical diagnosis of Alzheimer disease by measuring the cerebrospinal fluid ratio of phosphorylated tau protein to beta-amyloid peptide₄₂. *Archives of neurology* 60:1202-1206.
- Maes O. C., Kravitz S., Mawal Y., Su H., Liberman A., Mehindate K., Berlin D., Sahlas D. J., Chertkow H. M., Bergman H., i sur. (2006) Characterization of alpha₁-antitrypsin as a heme oxygenase-1 suppressor in Alzheimer plasma. *Neurobiol Dis* 24:89-100.
- Mahley R. W., Weisgraber K. H., Huang Y. (2006) Apolipoprotein E4: a causative factor and therapeutic target in neuropathology, including Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103:5644-5651.
- Maina G., Rosso G., Zanardini R., Bogetto F., Gennarelli M., Bocchio-Chiavetto L. (2010) Serum levels of brain-derived neurotrophic factor in drug-naive obsessive-compulsive patients: a case-control study. *Journal of affective disorders* 122:174-178.
- Malisic E. J., Jankovic R. N., Radulovic S. S. (2010) An intronic variant in the TP53 gene in Serbian women with cervical or ovarian cancer. *Cancer genetics and cytogenetics* 198:173-175.
- Mandelkow E. M., Mandelkow E. (1994) Tau protein and Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging* 15 Suppl 2:S85-86.
- Mangialasche F., Solomon A., Winblad B., Mecocci P., Kivipelto M. (2010) Alzheimer's disease: clinical trials and drug development. *Lancet Neurol* 9:702-716.
- Marx J. (2007) Alzheimer's disease. A new take on tau. *Science* 316:1416-1417.
- Massa S. M., Yang T., Xie Y., Shi J., Bilgen M., Joyce J. N., Nehama D., Rajadas J., Longo F. M. (2010) Small molecule BDNF mimetics activate TrkB signaling and prevent neuronal degeneration in rodents. *The Journal of clinical investigation* 120:1774-1785.
- Matrone C., Ciotti M. T., Mercanti D., Marolda R., Calissano P. (2008) NGF and BDNF signaling control amyloidogenic route and Abeta production in hippocampal neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105:13139-13144.
- Matsubara E., Hirai S., Amari M., Shoji M., Yamaguchi H., Okamoto K., Ishiguro K., Harigaya Y., Wakabayashi K. (1990) Alpha 1-antichymotrypsin as a possible biochemical marker for Alzheimer-type dementia. *Annals of neurology* 28:561-567.
- Matsushita S., Arai H., Matsui T., Yuzuriha T., Urakami K., Masaki T., Higuchi S. (2005) Brain-derived neurotrophic factor gene polymorphisms and Alzheimer's disease. *Journal of neural transmission* 112:703-711.
- Mattson M. P. (2008) Glutamate and neurotrophic factors in neuronal plasticity and disease. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1144:97-112.
- Mattson M. P., Maudsley S., Martin B. (2004) BDNF and 5-HT: a dynamic duo in age-related neuronal plasticity and neurodegenerative disorders. *Trends in neurosciences* 27:589-594.

- McAllister A. K., Katz L. C., Lo D. C. (1999) Neurotrophins and synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci* 22:295-318.
- McCurry S. M., Logsdon R. G., Teri L., Gibbons L. E., Kukull W. A., Bowen J. D., McCormick W. C., Larson E. B. (1999) Characteristics of sleep disturbance in community-dwelling Alzheimer's disease patients. *Journal of geriatric psychiatry and neurology* 12:53-59.
- McKeith I. (2004) Dementia with Lewy bodies. *Dialogues in clinical neuroscience* 6:333-341.
- McKeith I., Mintzer J., Aarsland D., Burn D., Chiu H., Cohen-Mansfield J., Dickson D., Dubois B., Duda J. E., Feldman H., i sur. (2004) Dementia with Lewy bodies. *Lancet Neurol* 3:19-28.
- McKhann G., Drachman D., Folstein M., Katzman R., Price D., Stadlan E. M. (1984) Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology* 34:939-944.
- Meraz-Rios M. A., Lira-De Leon K. I., Campos-Pena V., De Anda-Hernandez M. A., Mena-Lopez R. (2010) Tau oligomers and aggregation in Alzheimer's disease. *Journal of neurochemistry* 112:1353-1367.
- Merchant C., Tang M. X., Albert S., Manly J., Stern Y., Mayeux R. (1999) The influence of smoking on the risk of Alzheimer's disease. *Neurology* 52:1408-1412.
- Merched A., Xia Y., Visvikis S., Serot J. M., Siest G. (2000) Decreased high-density lipoprotein cholesterol and serum apolipoprotein AI concentrations are highly correlated with the severity of Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging* 21:27-30.
- Michalski B., Fahnstock M. (2003) Pro-brain-derived neurotrophic factor is decreased in parietal cortex in Alzheimer's disease. *Brain research Molecular brain research* 111:148-154.
- Miller S. A., Dykes D. D., Polesky H. F. (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic acids research* 16:1215.
- Minger S. L., Esiri M. M., McDonald B., Keene J., Carter J., Hope T., Francis P. T. (2000) Cholinergic deficits contribute to behavioral disturbance in patients with dementia. *Neurology* 55:1460-1467.
- Minichiello L., Korte M., Wolfner D., Kuhn R., Unsicker K., Cestari V., Rossi-Arnaud C., Lipp H. P., Bonhoeffer T., Klein R. (1999) Essential role for TrkB receptors in hippocampus-mediated learning. *Neuron* 24:401-414.
- Miyajima F., Ollier W., Mayes A., Jackson A., Thacker N., Rabbitt P., Pendleton N., Horan M., Payton A. (2008) Brain-derived neurotrophic factor polymorphism Val66Met influences cognitive abilities in the elderly. *Genes, brain, and behavior* 7:411-417.
- Molendijk M. L., Bus B. A., Spinhoven P., Penninx B. W., Kenis G., Prickaerts J., Voshaar R. C., Elzinga B. M. (2011) Serum levels of brain-derived neurotrophic factor in major depressive disorder: state-trait issues, clinical features and pharmacological treatment. *Molecular psychiatry* 16:1088-1095.
- Momose Y., Murata M., Kobayashi K., Tachikawa M., Nakabayashi Y., Kanazawa I., Toda T. (2002) Association studies of multiple candidate genes for Parkinson's disease using single nucleotide polymorphisms. *Annals of neurology* 51:133-136.
- Monteleone P., Fabrazzo M., Martiadis V., Serritella C., Pannuto M., Maj M. (2005) Circulating brain-derived neurotrophic factor is decreased in women with anorexia and bulimia nervosa but not in women with binge-eating disorder: relationships to co-morbid depression, psychopathology and hormonal variables. *Psychological medicine* 35:897-905.
- Monteleone P., Tortorella A., Martiadis V., Serritella C., Fuschino A., Maj M. (2004) Opposite changes in the serum brain-derived neurotrophic factor in anorexia nervosa and obesity. *Psychosomatic medicine* 66:744-748.

- Montine T. J., Beal M. F., Cudkowicz M. E., O'Donnell H., Margolin R. A., McFarland L., Bachrach A. F., Zackert W. E., Roberts L. J., Morrow J. D. (1999) Increased CSF F2-isoprostane concentration in probable AD. *Neurology* 52:562-565.
- Montine T. J., Kaye J. A., Montine K. S., McFarland L., Morrow J. D., Quinn J. F. (2001) Cerebrospinal fluid abeta42, tau, and f2-isoprostane concentrations in patients with Alzheimer disease, other dementias, and in age-matched controls. *Archives of pathology & laboratory medicine* 125:510-512.
- Montine T. J., Shinobu L., Montine K. S., Roberts L. J., 2nd, Kowall N. W., Beal M. F., Morrow J. D. (2000) No difference in plasma or urinary F2-isoprostanes among patients with Huntington's disease or Alzheimer's disease and controls. *Annals of neurology* 48:950.
- Moran M., Lynch C. A., Walsh C., Coen R., Coakley D., Lawlor B. A. (2005) Sleep disturbance in mild to moderate Alzheimer's disease. *Sleep medicine* 6:347-352.
- Mosimann U. P., McKeith I. G. (2003) Dementia with lewy bodies--diagnosis and treatment. *Swiss medical weekly* 133:131-142.
- Mossello E., Ballini E., Mello A. M., Tarantini F., Simoni D., Baldasseroni S., Marchionni N. (2011) Biomarkers of Alzheimer's Disease: From Central Nervous System to Periphery? . *International Journal of Alzheimer's Disease* 2011:7.
- Mrak R. E., Griffin W. S. (2005) Potential inflammatory biomarkers in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 8:369-375.
- Mullan M., Crawford F., Axelman K., Houlden H., Lilius L., Winblad B., Lannfelt L. (1992) A pathogenic mutation for probable Alzheimer's disease in the APP gene at the N-terminus of beta-amyloid. *Nature genetics* 1:345-347.
- Murer M. G., Boissiere F., Yan Q., Hunot S., Villares J., Faucheux B., Agid Y., Hirsch E., Raisman-Vozari R. (1999) An immunohistochemical study of the distribution of brain-derived neurotrophic factor in the adult human brain, with particular reference to Alzheimer's disease. *Neuroscience* 88:1015-1032.
- Murer M. G., Yan Q., Raisman-Vozari R. (2001) Brain-derived neurotrophic factor in the control human brain, and in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Progress in neurobiology* 63:71-124.
- Musicco M. (2009) Gender differences in the occurrence of Alzheimer's disease. *Functional neurology* 24:89-92.
- Nacmias B., Piccini C., Bagnoli S., Tedde A., Cellini E., Bracco L., Sorbi S. (2004) Brain-derived neurotrophic factor, apolipoprotein E genetic variants and cognitive performance in Alzheimer's disease. *Neuroscience letters* 367:379-383.
- Nagahara A. H., Merrill D. A., Coppola G., Tsukada S., Schroeder B. E., Shaked G. M., Wang L., Blesch A., Kim A., Conner J. M., i sur. (2009) Neuroprotective effects of brain-derived neurotrophic factor in rodent and primate models of Alzheimer's disease. *Nature medicine* 15:331-337.
- Nagata T., Kobayashi N., Shinagawa S., Yamada H., Kondo K., Nakayama K. (2014) Plasma BDNF levels are correlated with aggressiveness in patients with amnesic mild cognitive impairment or Alzheimer disease. *Journal of neural transmission* 121:433-441.
- Nagata T., Shinagawa S., Nukariya K., Ochiai Y., Kawamura S., Agawa-Ohta M., Kasahara H., Nakayama K., Yamada H. (2011) Association between brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene polymorphisms and executive function in Japanese patients with Alzheimer's disease. *Psychogeriatrics : the official journal of the Japanese Psychogeriatric Society* 11:141-149.
- Nakahashi T., Fujimura H., Altar C. A., Li J., Kambayashi J., Tandon N. N., Sun B. (2000) Vascular endothelial cells synthesize and secrete brain-derived neurotrophic factor. *FEBS letters* 470:113-117.

- Narisawa-Saito M., Wakabayashi K., Tsuji S., Takahashi H., Nawa H. (1996) Regional specificity of alterations in NGF, BDNF and NT-3 levels in Alzheimer's disease. *Neuroreport* 7:2925-2928.
- Nathan B. P., Bellosta S., Sanan D. A., Weisgraber K. H., Mahley R. W., Pitas R. E. (1994) Differential effects of apolipoproteins E3 and E4 on neuronal growth in vitro. *Science* 264:850-852.
- Nettiksimmons J., Simonsick E. M., Harris T., Satterfield S., Rosano C., Yaffe K., Health A. B. C. S. (2014) The associations between serum brain-derived neurotrophic factor, potential confounders, and cognitive decline: a longitudinal study. *PLoS one* 9:e91339.
- Neves-Pereira M., Mundo E., Muglia P., King N., Macciardi F., Kennedy J. L. (2002) The brain-derived neurotrophic factor gene confers susceptibility to bipolar disorder: evidence from a family-based association study. *American journal of human genetics* 71:651-655.
- Newman A. B., Fitzpatrick A. L., Lopez O., Jackson S., Lyketsos C., Jagust W., Ives D., Dekosky S. T., Kuller L. H. (2005) Dementia and Alzheimer's disease incidence in relationship to cardiovascular disease in the Cardiovascular Health Study cohort. *Journal of the American Geriatrics Society* 53:1101-1107.
- Ngandu T., von Strauss E., Helkala E. L., Winblad B., Nissinen A., Tuomilehto J., Soininen H., Kivipelto M. (2007) Education and dementia: what lies behind the association? *Neurology* 69:1442-1450.
- Nickerson D. A., Taylor S. L., Fullerton S. M., Weiss K. M., Clark A. G., Stengard J. H., Salomaa V., Boerwinkle E., Sing C. F. (2000) Sequence diversity and large-scale typing of SNPs in the human apolipoprotein E gene. *Genome research* 10:1532-1545.
- Nilsson A. S., Fainzilber M., Falck P., Ibanez C. F. (1998) Neurotrophin-7: a novel member of the neurotrophin family from the zebrafish. *FEBS letters* 424:285-290.
- Nishimura A. L., Oliveira J. R., Mitne-Neto M., Guindalini C., Nitrini R., Bahia V. S., de Brito-Marques P. R., Otto P. A., Zatz M. (2004) Lack of association between the brain-derived neurotrophin factor (C-270T) polymorphism and late-onset Alzheimer's disease (LOAD) in Brazilian patients. *Journal of molecular neuroscience : MN* 22:257-260.
- Nishimura M., Kuno S., Kaji R., Kawakami H. (2005) Brain-derived neurotrophic factor gene polymorphisms in Japanese patients with sporadic Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and multiple system atrophy. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 20:1031-1033.
- Nishiwaki Y., Breeze E., Smeeth L., Bulpitt C. J., Peters R., Fletcher A. E. (2004) Validity of the Clock-Drawing Test as a screening tool for cognitive impairment in the elderly. *American journal of epidemiology* 160:797-807.
- Noble E. E., Billington C. J., Kotz C. M., Wang C. (2011) The lighter side of BDNF. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology* 300:R1053-1069.
- Nussbaum R. L., Ellis C. E. (2003) Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *The New England journal of medicine* 348:1356-1364.
- Nykjaer A., Lee R., Teng K. K., Jansen P., Madsen P., Nielsen M. S., Jacobsen C., Kliemann M., Schwarz E., Willnow T. E., et al. (2004) Sortilin is essential for proNGF-induced neuronal cell death. *Nature* 427:843-848.
- Olin D., MacMurray J., Comings D. E. (2005) Risk of late-onset Alzheimer's disease associated with BDNF C270T polymorphism. *Neuroscience letters* 381:275-278.
- Oprisiu R., Serot J. M., Godefroy O., Black S. E., Fournier A. (2006) Plasma amyloid-beta concentrations in Alzheimer's disease: an alternative hypothesis. *Lancet Neurol* 5:1001-1002; author reply 1002-1003.
- Ott A., Slioter A. J., Hofman A., van Harskamp F., Witteman J. C., Van Broeckhoven C., van Duijn C. M., Breteler M. M. (1998) Smoking and risk of dementia and Alzheimer's disease in a population-based cohort study: the Rotterdam Study. *Lancet* 351:1840-1843.

- Ozan E., Okur H., Eker C., Eker O. D., Gonul A. S., Akarsu N. (2010) The effect of depression, BDNF gene val66met polymorphism and gender on serum BDNF levels. *Brain research bulletin* 81:61-65.
- Paik Y. K., Chang D. J., Reardon C. A., Davies G. E., Mahley R. W., Taylor J. M. (1985) Nucleotide sequence and structure of the human apolipoprotein E gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82:3445-3449.
- Pan W., Banks W. A., Fasold M. B., Bluth J., Kastin A. J. (1998a) Transport of brain-derived neurotrophic factor across the blood-brain barrier. *Neuropharmacology* 37:1553-1561.
- Pan W., Banks W. A., Kastin A. J. (1998b) Permeability of the blood-brain barrier to neurotrophins. *Brain research* 788:87-94.
- Parker W. D., Jr., Filley C. M., Parks J. K. (1990) Cytochrome oxidase deficiency in Alzheimer's disease. *Neurology* 40:1302-1303.
- Pedrini S., Thomas C., Brautigam H., Schmeidler J., Ho L., Fraser P., Westaway D., Hyslop P. S., Martins R. N., Buxbaum J. D., i sur. (2009) Dietary composition modulates brain mass and solubilizable A β levels in a mouse model of aggressive Alzheimer's amyloid pathology. *Molecular neurodegeneration* 4:40.
- Pelleymounter M. A., Cullen M. J., Wellman C. L. (1995) Characteristics of BDNF-induced weight loss. *Experimental neurology* 131:229-238.
- Pendlebury S. T., Rothwell P. M. (2009) Prevalence, incidence, and factors associated with pre-stroke and post-stroke dementia: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Neurol* 8:1006-1018.
- Peng S., Wu J., Mufson E. J., Fahnestock M. (2005) Precursor form of brain-derived neurotrophic factor and mature brain-derived neurotrophic factor are decreased in the pre-clinical stages of Alzheimer's disease. *Journal of neurochemistry* 93:1412-1421.
- Perroud N., Aitchison K. J., Uher R., Smith R., Huezio-Diaz P., Marusic A., Maier W., Mors O., Placentino A., Henigsberg N., i sur. (2009) Genetic predictors of increase in suicidal ideation during antidepressant treatment in the GENDEP project. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 34:2517-2528.
- Pesaresi M., Lovati C., Bertora P., Mailland E., Galimberti D., Scarpini E., Quadri P., Forloni G., Mariani C. (2006) Plasma levels of beta-amyloid (1-42) in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Neurobiology of aging* 27:904-905.
- Petersen R. C. (2004) Mild cognitive impairment as a diagnostic entity. *Journal of internal medicine* 256:183-194.
- Petersen R. C., Roberts R. O., Knopman D. S., Boeve B. F., Geda Y. E., Ivnik R. J., Smith G. E., Jack C. R., Jr. (2009) Mild cognitive impairment: ten years later. *Archives of neurology* 66:1447-1455.
- Petersen R. C., Smith G. E., Waring S. C., Ivnik R. J., Tangalos E. G., Kokmen E. (1999) Mild cognitive impairment: clinical characterization and outcome. *Archives of neurology* 56:303-308.
- Pezawas L., Verchinski B. A., Mattay V. S., Callicott J. H., Kolachana B. S., Straub R. E., Egan M. F., Meyer-Lindenberg A., Weinberger D. R. (2004) The brain-derived neurotrophic factor val66met polymorphism and variation in human cortical morphology. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 24:10099-10102.
- Pfriefer F. W. (2003) Cholesterol homeostasis and function in neurons of the central nervous system. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 60:1158-1171.
- Piccinni A., Marazziti D., Catena M., Domenici L., Del Debbio A., Bianchi C., Mannari C., Martini C., Da Pozzo E., Schiavi E., i sur. (2008) Plasma and serum brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in depressed patients during 1 year of antidepressant treatments. *Journal of affective disorders* 105:279-283.

- Pillai A., Bruno D., Sarreal A. S., Hernando R. T., Saint-Louis L. A., Nierenberg J., Ginsberg S. D., Pomara N., Mehta P. D., Zetterberg H., i sur. (2012) Plasma BDNF levels vary in relation to body weight in females. *PLoS one* 7:e39358.
- Pitas R. E., Boyles J. K., Lee S. H., Hui D., Weisgraber K. H. (1987) Lipoproteins and their receptors in the central nervous system. Characterization of the lipoproteins in cerebrospinal fluid and identification of apolipoprotein B,E(LDL) receptors in the brain. *The Journal of biological chemistry* 262:14352-14360.
- Pivac N., Nikolac M., Nedic G., Mustapic M., Borovecki F., Hajnsek S., Presecki P., Pavlovic M., Mimica N., Muck Seler D. (2011) Brain derived neurotrophic factor Val66Met polymorphism and psychotic symptoms in Alzheimer's disease. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry* 35:356-362.
- Poduslo J. F., Curran G. L. (1996) Permeability at the blood-brain and blood-nerve barriers of the neurotrophic factors: NGF, CNTF, NT-3, BDNF. *Brain research Molecular brain research* 36:280-286.
- Povova J., Ambroz P., Bar M., Pavukova V., Sery O., Tomaskova H., Janout V. (2012) Epidemiological of and risk factors for Alzheimer's disease: a review. *Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czechoslovakia* 156:108-114.
- Pratico D., Clark C. M., Lee V. M., Trojanowski J. Q., Rokach J., FitzGerald G. A. (2000) Increased 8,12-iso-iPF2alpha-VI in Alzheimer's disease: correlation of a noninvasive index of lipid peroxidation with disease severity. *Annals of neurology* 48:809-812.
- Pratico D., Clark C. M., Liun F., Rokach J., Lee V. Y., Trojanowski J. Q. (2002) Increase of brain oxidative stress in mild cognitive impairment: a possible predictor of Alzheimer disease. *Archives of neurology* 59:972-976.
- Pratico D., V M. Y. L., Trojanowski J. Q., Rokach J., Fitzgerald G. A. (1998) Increased F2-isoprostanes in Alzheimer's disease: evidence for enhanced lipid peroxidation in vivo. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 12:1777-1783.
- Price J. L., Ko A. I., Wade M. J., Tsou S. K., McKeel D. W., Morris J. C. (2001) Neuron number in the entorhinal cortex and CA1 in preclinical Alzheimer disease. *Archives of neurology* 58:1395-1402.
- Price N. C. (1996) *Proteins*. Oxford: Academic Press.
- Prince M., Bryce R., Albanese E., Wimo A., Ribeiro W., Ferri C. P. (2013) The global prevalence of dementia: A systematic review and metaanalysis. *Alzheimers Dement* 9:63-75.
- Pritchard A. L., Harris J., Pritchard C. W., Coates J., Haque S., Holder R., Bentham P., Lendon C. L. (2007) The effect of the apolipoprotein E gene polymorphisms and haplotypes on behavioural and psychological symptoms in probable Alzheimer's disease. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 78:123-126.
- Pritchard A. L., Pritchard C. W., Bentham P., Lendon C. L. (2008) Investigation of the role of the dopamine transporter in susceptibility to behavioural and psychological symptoms of patients with probable Alzheimer's disease. *Dementia and geriatric cognitive disorders* 26:257-260.
- Pritchard A. L., Ratcliffe L., Sorour E., Haque S., Holder R., Bentham P., Lendon C. L. (2009) Investigation of dopamine receptors in susceptibility to behavioural and psychological symptoms in Alzheimer's disease. *Int J Geriatr Psychiatry* 24:1020-1025.
- Pruunsild P., Kazantseva A., Aid T., Palm K., Timmusk T. (2007) Dissecting the human BDNF locus: bidirectional transcription, complex splicing, and multiple promoters. *Genomics* 90:397-406.
- Qiu C., Backman L., Winblad B., Aguero-Torres H., Fratiglioni L. (2001) The influence of education on clinically diagnosed dementia incidence and mortality data from the Kungsholmen Project. *Archives of neurology* 58:2034-2039.

- Quaranta D., Bizzarro A., Marra C., Vita M. G., Seripa D., Pilotto A., Sebastiani V., Mecocci P., Masullo C. (2009) Psychotic symptoms in Alzheimer's disease and 5-HTTLPR polymorphism of the serotonin transporter gene: evidence for an association. *J Alzheimers Dis* 16:173-180.
- Rabinovici G. D., Miller B. L. (2010) Frontotemporal lobar degeneration: epidemiology, pathophysiology, diagnosis and management. *CNS drugs* 24:375-398.
- Rattiner L. M., Davis M., Ressler K. J. (2004) Differential regulation of brain-derived neurotrophic factor transcripts during the consolidation of fear learning. *Learning & memory* 11:727-731.
- Reed B. R., Eberling J. L., Mungas D., Weiner M., Kramer J. H., Jagust W. J. (2004) Effects of white matter lesions and lacunes on cortical function. *Archives of neurology* 61:1545-1550.
- Reichardt L. F. (2006) Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences* 361:1545-1564.
- Reichardt L. F., Farinas I. (1997) Neurotrophic factors and their receptors. Roles in neuronal development and function. In: *Molecular and Cellular Approaches to Neural Development* (Cowan, W. M. i sur., eds), pp 220-263 New York Oxford Univ. Press.
- Reiman E. M., Webster J. A., Myers A. J., Hardy J., Dunckley T., Zismann V. L., Joshipura K. D., Pearson J. V., Hu-Lince D., Huentelman M. J., i sur. (2007) GAB2 alleles modify Alzheimer's risk in APOE epsilon4 carriers. *Neuron* 54:713-720.
- Reisberg B., Auer S. R., Monteiro I. M. (1996) Behavioral pathology in Alzheimer's disease (BEHAVE-AD) rating scale. *International psychogeriatrics / IPA 8 Suppl* 3:301-308; discussion 351-304.
- Riemenschneider M., Schwarz S., Wagenpfeil S., Diehl J., Muller U., Forstl H., Kurz A. (2002a) A polymorphism of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is associated with Alzheimer's disease in patients lacking the Apolipoprotein E epsilon4 allele. *Molecular psychiatry* 7:782-785.
- Riemenschneider M., Wagenpfeil S., Diehl J., Lautenschlager N., Thiel T., Heldmann B., Drzezga A., Jahn T., Forstl H., Kurz A. (2002b) Tau and Abeta42 protein in CSF of patients with frontotemporal degeneration. *Neurology* 58:1622-1628.
- Rocchi A., Micheli D., Ceravolo R., Manca M. L., Tognoni G., Siciliano G., Murri L. (2003) Serotonergic polymorphisms (5-HTTLPR and 5-HT2A): association studies with psychosis in Alzheimer disease. *Genetic testing* 7:309-314.
- Rockwood K., Kirkland S., Hogan D. B., MacKnight C., Merry H., Verreault R., Wolfson C., McDowell I. (2002) Use of lipid-lowering agents, indication bias, and the risk of dementia in community-dwelling elderly people. *Archives of neurology* 59:223-227.
- Rogaeva E., Meng Y., Lee J. H., Gu Y., Kawarai T., Zou F., Katayama T., Baldwin C. T., Cheng R., Hasegawa H., i sur. (2007) The neuronal sortilin-related receptor SORL1 is genetically associated with Alzheimer disease. *Nature genetics* 39:168-177.
- Rohe M., Synowitz M., Glass R., Paul S. M., Nykjaer A., Willnow T. E. (2009) Brain-derived neurotrophic factor reduces amyloidogenic processing through control of SORLA gene expression. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 29:15472-15478.
- Roman G. C. (2002) Vascular dementia revisited: diagnosis, pathogenesis, treatment, and prevention. *The Medical clinics of North America* 86:477-499.
- Roman G. C., Tatemichi T. K., Erkinjuntti T., Cummings J. L., Masdeu J. C., Garcia J. H., Amaducci L., Orgogozo J. M., Brun A., Hofman A., i sur. (1993) Vascular dementia: diagnostic criteria for research studies. Report of the NINDS-AIREN International Workshop. *Neurology* 43:250-260.
- Rosas-Vargas H., Martinez-Ezquerro J. D., Bienvenu T. (2011) Brain-derived neurotrophic factor, food intake regulation, and obesity. *Archives of medical research* 42:482-494.
- Rosen W. G., Mohs R. C., Davis K. L. (1984) A new rating scale for Alzheimer's disease. *The American journal of psychiatry* 141:1356-1364.

- Rosengren A., Skoog I., Gustafson D., Wilhelmsen L. (2005) Body mass index, other cardiovascular risk factors, and hospitalization for dementia. *Arch Intern Med* 165:321-326.
- Roses A. D. (1996) Apolipoprotein E alleles as risk factors in Alzheimer's disease. *Annu Rev Med* 47:387-400.
- Rostami E., Krueger F., Zoubak S., Dal Monte O., Raymont V., Pardini M., Hodgkinson C. A., Goldman D., Risling M., Grafman J. (2011) BDNF polymorphism predicts general intelligence after penetrating traumatic brain injury. *PLoS one* 6:e27389.
- Rybakowski J. K., Borkowska A., Czerski P. M., Skibinska M., Hauser J. (2003) Polymorphism of the brain-derived neurotrophic factor gene and performance on a cognitive prefrontal test in bipolar patients. *Bipolar disorders* 5:468-472.
- Saadipour K., Yang M., Lim Y., Georgiou K., Sun Y., Keating D., Liu J., Wang Y. R., Gai W. P., Zhong J. H., i sur. (2013) Amyloid beta(1-42) (A β (42)) up-regulates the expression of sortilin via the p75(NTR)/RhoA signaling pathway. *Journal of neurochemistry* 127:152-162.
- Saarela M. S., Lehtimäki T., Rinne J. O., Huhtala H., Rontu R., Hervonen A., Roytta M., Ahonen J. P., Mattila K. M. (2006) No association between the brain-derived neurotrophic factor 196 G>A or 270 C>T polymorphisms and Alzheimer's or Parkinson's disease. *Folia neuropathologica / Association of Polish Neuropathologists and Medical Research Centre, Polish Academy of Sciences* 44:12-16.
- Saczynski J. S., Pfeifer L. A., Masaki K., Korff E. S., Laurin D., White L., Launer L. J. (2006) The effect of social engagement on incident dementia: the Honolulu-Asia Aging Study. *American journal of epidemiology* 163:433-440.
- Salehi B., Preuss N., van der Veen J. W., Shen J., Neumeister A., Drevets W. C., Hodgkinson C., Goldman D., Wendland J. R., Singleton A., i sur. (2013) Age-modulated association between prefrontal NAA and the BDNF gene. *The international journal of neuropsychopharmacology / official scientific journal of the Collegium Internationale Neuropsychopharmacologicum* 16:1185-1193.
- Sarbassov D. D., Guertin D. A., Ali S. M., Sabatini D. M. (2005) Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* 307:1098-1101.
- Sato N., Ueki A., Ueno H., Shinjo H., Morita Y. (2009) Dopamine D3 receptor gene polymorphism influences on behavioral and psychological symptoms of dementia (BPSD) in mild dementia of Alzheimer's type. *J Alzheimers Dis* 17:441-448.
- Savaskan E., Müller-Spahn F., Olivieri G., Brüttel S., Otten U., Rosenberg C., Hulette C., Hock C. (2000) Alterations in trk A, trk B and trk C receptor immunoreactivities in parietal cortex and cerebellum in Alzheimer's disease. *European neurology* 44:172-180.
- Scharfman H. E., MacLusky N. J. (2006) Estrogen and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in hippocampus: complexity of steroid hormone-growth factor interactions in the adult CNS. *Frontiers in neuroendocrinology* 27:415-435.
- Schinder A. F., Poo M. (2000) The neurotrophin hypothesis for synaptic plasticity. *Trends in neurosciences* 23:639-645.
- Schjeide B. M., McQueen M. B., Mullin K., DiVito J., Hogan M. F., Parkinson M., Hooli B., Lange C., Blacker D., Tanzi R. E., i sur. (2009) Assessment of Alzheimer's disease case-control associations using family-based methods. *Neurogenetics* 10:19-25.
- Schuman E. M. (1999) Neurotrophin regulation of synaptic transmission. *Current opinion in neurobiology* 9:105-109.
- Sen S., Nesse R. M., Stoltenberg S. F., Li S., Gleiberman L., Chakravarti A., Weder A. B., Burmeister M. (2003) A BDNF coding variant is associated with the NEO personality inventory domain neuroticism, a risk factor for depression. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 28:397-401.

- Serretti A., Olgiati P., De Ronchi D. (2007) Genetics of Alzheimer's disease. A rapidly evolving field. *J Alzheimers Dis* 12:73-92.
- Sharp E. S., Gatz M. (2011) Relationship between education and dementia: an updated systematic review. *Alzheimer disease and associated disorders* 25:289-304.
- Shaw L. M., Vanderstichele H., Knapik-Czajka M., Clark C. M., Aisen P. S., Petersen R. C., Blennow K., Soares H., Simon A., Lewczuk P., i sur. (2009) Cerebrospinal fluid biomarker signature in Alzheimer's disease neuroimaging initiative subjects. *Annals of neurology* 65:403-413.
- Shaywitz A. J., Greenberg M. E. (1999) CREB: a stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals. *Annual review of biochemistry* 68:821-861.
- Shen J., Kelleher R. J., 3rd (2007) The presenilin hypothesis of Alzheimer's disease: evidence for a loss-of-function pathogenic mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104:403-409.
- Shimada A., Mason C. A., Morrison M. E. (1998) TrkB signaling modulates spine density and morphology independent of dendrite structure in cultured neonatal Purkinje cells. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 18:8559-8570.
- Shimada H., Makizako H., Doi T., Yoshida D., Tsutsumimoto K., Anan Y., Uemura K., Lee S., Park H., Suzuki T. (2014) A large, cross-sectional observational study of serum BDNF, cognitive function, and mild cognitive impairment in the elderly. *Frontiers in aging neuroscience* 6:69.
- Siegel G. J., Chauhan N. B. (2000) Neurotrophic factors in Alzheimer's and Parkinson's disease brain. *Brain research Brain research reviews* 33:199-227.
- Simon S. S., Yokomizo J. E., Bottino C. M. (2012) Cognitive intervention in amnesic Mild Cognitive Impairment: a systematic review. *Neuroscience and biobehavioral reviews* 36:1163-1178.
- Simonsen A. H., McGuire J., Hansson O., Zetterberg H., Podust V. N., Davies H. A., Waldemar G., Minthon L., Blennow K. (2007) Novel panel of cerebrospinal fluid biomarkers for the prediction of progression to Alzheimer dementia in patients with mild cognitive impairment. *Archives of neurology* 64:366-370.
- Sjogren M., Davidsson P., Gottfries J., Vanderstichele H., Edman A., Vanmechelen E., Wallin A., Blennow K. (2001) The cerebrospinal fluid levels of tau, growth-associated protein-43 and soluble amyloid precursor protein correlate in Alzheimer's disease, reflecting a common pathophysiological process. *Dementia and geriatric cognitive disorders* 12:257-264.
- Sjogren M., Minthon L., Davidsson P., Granerus A. K., Clarberg A., Vanderstichele H., Vanmechelen E., Wallin A., Blennow K. (2000) CSF levels of tau, beta-amyloid(1-42) and GAP-43 in frontotemporal dementia, other types of dementia and normal aging. *Journal of neural transmission* 107:563-579.
- Sklar P., Gabriel S. B., McClinnis M. G., Bennett P., Lim Y., Tsan G., Schaffner S., Kirov G., Jones I., Owen M., i sur. (2002) Family-based association study of 76 candidate genes in bipolar disorder: BDNF is a potential risk locus. *Brain-derived neurotrophic factor. Molecular psychiatry* 7:579-593.
- Slegers K., Roks G., Theuns J., Aulchenko Y. S., Rademakers R., Cruts M., van Gool W. A., Van Broeckhoven C., Heutink P., Oostra B. A., i sur. (2004) Familial clustering and genetic risk for dementia in a genetically isolated Dutch population. *Brain* 127:1641-1649.
- Small S. A., Duff K. (2008) Linking Abeta and tau in late-onset Alzheimer's disease: a dual pathway hypothesis. *Neuron* 60:534-542.
- Snowdon D. A., Greiner L. H., Mortimer J. A., Riley K. P., Greiner P. A., Markesbery W. R. (1997) Brain infarction and the clinical expression of Alzheimer disease. *The Nun Study. Jama* 277:813-817.
- Sofroniew M. V., Howe C. L., Mobley W. C. (2001) Nerve growth factor signaling, neuroprotection, and neural repair. *Annu Rev Neurosci* 24:1217-1281.

- Sohrabji F., Lewis D. K. (2006) Estrogen-BDNF interactions: implications for neurodegenerative diseases. *Frontiers in neuroendocrinology* 27:404-414.
- Solomon A., Kareholt I., Ngandu T., Winblad B., Nissinen A., Tuomilehto J., Soininen H., Kivipelto M. (2007) Serum cholesterol changes after midlife and late-life cognition: twenty-one-year follow-up study. *Neurology* 68:751-756.
- Spalletta G., Bernardini S., Bellincampi L., Federici G., Trequattrini A., Caltagirone C. (2006) Delusion symptoms are associated with ApoE epsilon4 allelic variant at the early stage of Alzheimer's disease with late onset. *European journal of neurology : the official journal of the European Federation of Neurological Societies* 13:176-182.
- Spinsanti G., Zannolli R., Panti C., Ceccarelli I., Marsili L., Bachiocco V., Frati F., Aloisi A. M. (2008) Quantitative Real-Time PCR detection of TRPV1-4 gene expression in human leukocytes from healthy and hyposensitive subjects. *Molecular pain* 4:51.
- St Clair D., Rennie M., Slorach E., Norrman J., Yates C., Carothers A. (1995) Apolipoprotein E epsilon 4 allele is a risk factor for familial and sporadic presenile Alzheimer's disease in both homozygote and heterozygote carriers. *Journal of medical genetics* 32:642-644.
- Steinerman J. R., Irizarry M., Scarneas N., Raju S., Brandt J., Albert M., Blacker D., Hyman B., Stern Y. (2008) Distinct pools of beta-amyloid in Alzheimer disease-affected brain: a clinicopathologic study. *Archives of neurology* 65:906-912.
- Stephens M., Donnelly P. (2003) A comparison of bayesian methods for haplotype reconstruction from population genotype data. *American journal of human genetics* 73:1162-1169.
- Stephens M., Smith N. J., Donnelly P. (2001) A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *American journal of human genetics* 68:978-989.
- Stoilov P., Castren E., Stamm S. (2002) Analysis of the human TrkB gene genomic organization reveals novel TrkB isoforms, unusual gene length, and splicing mechanism. *Biochemical and biophysical research communications* 290:1054-1065.
- Strittmatter W. J., Saunders A. M., Schmechel D., Pericak-Vance M., Enghild J., Salvesen G. S., Roses A. D. (1993) Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90:1977-1981.
- Sukonick D. L., Pollock B. G., Sweet R. A., Mulsant B. H., Rosen J., Klunk W. E., Kastango K. B., DeKosky S. T., Ferrell R. E. (2001) The 5-HTTPR*S/*L polymorphism and aggressive behavior in Alzheimer disease. *Archives of neurology* 58:1425-1428.
- Suliman S., Hemmings S. M., Seedat S. (2013) Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) protein levels in anxiety disorders: systematic review and meta-regression analysis. *Frontiers in integrative neuroscience* 7:55.
- Sunderland T., Hill J. L., Mellow A. M., Lawlor B. A., Gundersheimer J., Newhouse P. A., Grafman J. H. (1989) Clock drawing in Alzheimer's disease. A novel measure of dementia severity. *Journal of the American Geriatrics Society* 37:725-729.
- Sunderland T., Mirza N., Putnam K. T., Linker G., Bhupali D., Durham R., Soares H., Kimmel L., Friedman D., Bergeson J., i sur. (2004) Cerebrospinal fluid beta-amyloid1-42 and tau in control subjects at risk for Alzheimer's disease: the effect of APOE epsilon4 allele. *Biological psychiatry* 56:670-676.
- Suwa M., Kishimoto H., Nofuji Y., Nakano H., Sasaki H., Radak Z., Kumagai S. (2006) Serum brain-derived neurotrophic factor level is increased and associated with obesity in newly diagnosed female patients with type 2 diabetes mellitus. *Metabolism: clinical and experimental* 55:852-857.
- Suzuki N., Cheung T. T., Cai X. D., Odaka A., Otvos L., Jr., Eckman C., Golde T. E., Younkin S. G. (1994) An increased percentage of long amyloid beta protein secreted by familial amyloid beta protein precursor (beta APP717) mutants. *Science* 264:1336-1340.

- Suzuki S., Kiyosue K., Hazama S., Ogura A., Kashihara M., Hara T., Koshimizu H., Kojima M. (2007) Brain-derived neurotrophic factor regulates cholesterol metabolism for synapse development. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 27:6417-6427.
- Sweet R. A., Nimgaonkar V. L., Kamboh M. I., Lopez O. L., Zhang F., DeKosky S. T. (1998) Dopamine receptor genetic variation, psychosis, and aggression in Alzheimer disease. *Archives of neurology* 55:1335-1340.
- Sweet R. A., Pollock B. G., Sukonick D. L., Mulsant B. H., Rosen J., Klunk W. E., Kastango K. B., DeKosky S. T., Ferrell R. E. (2001) The 5-HTTPR polymorphism confers liability to a combined phenotype of psychotic and aggressive behavior in Alzheimer disease. *International psychogeriatrics / IPA* 13:401-409.
- Swerdlow R. H. (2007) Is aging part of Alzheimer's disease, or is Alzheimer's disease part of aging? *Neurobiology of aging* 28:1465-1480.
- Swerdlow R. H., Khan S. M. (2004) A "mitochondrial cascade hypothesis" for sporadic Alzheimer's disease. *Medical hypotheses* 63:8-20.
- Swerdlow R. H., Kish S. J. (2002) Mitochondria in Alzheimer's disease. *International review of neurobiology* 53:341-385.
- Szeszko P. R., Lipsky R., Mentschel C., Robinson D., Gunduz-Bruce H., Sevy S., Ashtari M., Napolitano B., Bilder R. M., Kane J. M., i sur. (2005) Brain-derived neurotrophic factor val66met polymorphism and volume of the hippocampal formation. *Molecular psychiatry* 10:631-636.
- Tanaka J., Horiike Y., Matsuzaki M., Miyazaki T., Ellis-Davies G. C., Kasai H. (2008) Protein synthesis and neurotrophin-dependent structural plasticity of single dendritic spines. *Science* 319:1683-1687.
- Teng H. K., Teng K. K., Lee R., Wright S., Tevar S., Almeida R. D., Kermani P., Torkin R., Chen Z. Y., Lee F. S., i sur. (2005) ProBDNF induces neuronal apoptosis via activation of a receptor complex of p75NTR and sortilin. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 25:5455-5463.
- Terracciano A., Martin B., Ansari D., Tanaka T., Ferrucci L., Maudsley S., Mattson M. P., Costa P. T., Jr. (2010) Plasma BDNF concentration, Val66Met genetic variant and depression-related personality traits. *Genes, brain, and behavior* 9:512-518.
- Thongboonkerd V. (2007) Practical points in urinary proteomics. *Journal of proteome research* 6:3881-3890.
- Tiraboschi P., Hansen L. A., Masliah E., Alford M., Thal L. J., Corey-Bloom J. (2004) Impact of APOE genotype on neuropathologic and neurochemical markers of Alzheimer disease. *Neurology* 62:1977-1983.
- Tobias C. A., Dhoot N. O., Wheatley M. A., Tessler A., Murray M., Fischer I. (2001) Grafting of encapsulated BDNF-producing fibroblasts into the injured spinal cord without immune suppression in adult rats. *Journal of neurotrauma* 18:287-301.
- Trajkovska V., Marcussen A. B., Vinberg M., Hartvig P., Aznar S., Knudsen G. M. (2007) Measurements of brain-derived neurotrophic factor: methodological aspects and demographical data. *Brain research bulletin* 73:143-149.
- Tsai S. J., Gau Y. T., Liu M. E., Hsieh C. H., Liou Y. J., Hong C. J. (2008) Association study of brain-derived neurotrophic factor and apolipoprotein E polymorphisms and cognitive function in aged males without dementia. *Neuroscience letters* 433:158-162.
- Tsai S. J., Hong C. J., Liu H. C., Liu T. Y., Hsu L. E., Lin C. H. (2004) Association analysis of brain-derived neurotrophic factor Val66Met polymorphisms with Alzheimer's disease and age of onset. *Neuropsychobiology* 49:10-12.

- Tsai S. J., Hong C. J., Liu H. C., Liu T. Y., Liou Y. J. (2006) The brain-derived neurotrophic factor gene as a possible susceptibility candidate for Alzheimer's disease in a chinese population. *Dementia and geriatric cognitive disorders* 21:139-143.
- Tuppo E. E., Arias H. R. (2005) The role of inflammation in Alzheimer's disease. *The international journal of biochemistry & cell biology* 37:289-305.
- Tuppo E. E., Forman L. J., Spur B. W., Chan-Ting R. E., Chopra A., Cavalieri T. A. (2001) Sign of lipid peroxidation as measured in the urine of patients with probable Alzheimer's disease. *Brain research bulletin* 54:565-568.
- Tyler W. J., Pozzo-Miller L. (2003) Miniature synaptic transmission and BDNF modulate dendritic spine growth and form in rat CA1 neurones. *The Journal of physiology* 553:497-509.
- Ueki A., Ueno H., Sato N., Shinjo H., Morita Y. (2007) Serotonin transporter gene polymorphism and BPSD in mild Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 12:245-253.
- Van Den Heuvel C., Thornton E., Vink R. (2007) Traumatic brain injury and Alzheimer's disease: a review. *Progress in brain research* 161:303-316.
- Ventriglia M., Bocchio Chiavetto L., Benussi L., Binetti G., Zanetti O., Riva M. A., Gennarelli M. (2002) Association between the BDNF 196 A/G polymorphism and sporadic Alzheimer's disease. *Molecular psychiatry* 7:136-137.
- Ventriglia M., Zanardini R., Bonomini C., Zanetti O., Volpe D., Pasqualetti P., Gennarelli M., Bocchio-Chiavetto L. (2013) Serum brain-derived neurotrophic factor levels in different neurological diseases. *BioMed research international* 2013:901082.
- Vepsalainen S., Castren E., Helisalmi S., Iivonen S., Mannermaa A., Lehtovirta M., Hanninen T., Soininen H., Hiltunen M. (2005) Genetic analysis of BDNF and TrkB gene polymorphisms in Alzheimer's disease. *Journal of neurology* 252:423-428.
- Voineskos A. N., Lerch J. P., Felsky D., Shaikh S., Rajji T. K., Miranda D., Lobaugh N. J., Mulsant B. H., Pollock B. G., Kennedy J. L. (2011) The brain-derived neurotrophic factor Val66Met polymorphism and prediction of neural risk for Alzheimer disease. *Archives of general psychiatry* 68:198-206.
- Walker A. J., Meares S., Sachdev P. S., Brodaty H. (2005) The differentiation of mild frontotemporal dementia from Alzheimer's disease and healthy aging by neuropsychological tests. *International psychogeriatrics / IPA* 17:57-68.
- Walter J., Capell A., Grunberg J., Pesold B., Schindzielorz A., Prior R., Podlisny M. B., Fraser P., Hyslop P. S., Selkoe D. J., i sur. (1996) The Alzheimer's disease-associated presenilins are differentially phosphorylated proteins located predominantly within the endoplasmic reticulum. *Molecular medicine* 2:673-691.
- Wang H. X., Karp A., Winblad B., Fratiglioni L. (2002) Late-life engagement in social and leisure activities is associated with a decreased risk of dementia: a longitudinal study from the Kungsholmen project. *American journal of epidemiology* 155:1081-1087.
- Wang Y., Mathews C. A., Li Y., Lin Z., Xiao Z. (2011) Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) plasma levels in drug-naive OCD patients are lower than those in healthy people, but are not lower than those in drug-treated OCD patients. *Journal of affective disorders* 133:305-310.
- Warren J. D., Rohrer J. D., Rossor M. N. (2013) Clinical review. Frontotemporal dementia. *Bmj* 347:f4827.
- Webster J., Reiman E. M., Zismann V. L., Joshipura K. D., Pearson J. V., Hu-Lince D., Huentelman M. J., Craig D. W., Coon K. D., Beach T., i sur. (2010) Whole genome association analysis shows that ACE is a risk factor for Alzheimer's disease and fails to replicate most candidates from Meta-analysis. *International journal of molecular epidemiology and genetics* 1:19-30.

- Wenk G. L. (2003) Neuropathologic changes in Alzheimer's disease. *The Journal of clinical psychiatry* 64 Suppl 9:7-10.
- Weyer G., Erzigkeit H., Kanowski S., Ihl R., Hadler D. (1997) Alzheimer's Disease Assessment Scale: reliability and validity in a multicenter clinical trial. *International psychogeriatrics / IPA* 9:123-138.
- White J. A., Manelli A. M., Holmberg K. H., Van Eldik L. J., Ladu M. J. (2005) Differential effects of oligomeric and fibrillar amyloid-beta 1-42 on astrocyte-mediated inflammation. *Neurobiol Dis* 18:459-465.
- Whitmer R. A., Gunderson E. P., Barrett-Connor E., Quesenberry C. P., Jr., Yaffe K. (2005) Obesity in middle age and future risk of dementia: a 27 year longitudinal population based study. *Bmj* 330:1360.
- Whitmer R. A., Gustafson D. R., Barrett-Connor E., Haan M. N., Gunderson E. P., Yaffe K. (2008) Central obesity and increased risk of dementia more than three decades later. *Neurology* 71:1057-1064.
- WHO (2010) World health organisation: International statistical classification of diseases and related health problems, 10th revision (ICD-10). Geneva: World health organization.
- Wilkosz P. A., Kodavali C., Weamer E. A., Miyahara S., Lopez O. L., Nimgaonkar V. L., DeKosky S. T., Sweet R. A. (2007) Prediction of psychosis onset in Alzheimer disease: the role of depression symptom severity and the HTR2A T102C polymorphism. *American journal of medical genetics Part B, Neuropsychiatric genetics : the official publication of the International Society of Psychiatric Genetics* 144B:1054-1062.
- Wisniewski T., Frangione B. (1992) Apolipoprotein E: a pathological chaperone protein in patients with cerebral and systemic amyloid. *Neuroscience letters* 135:235-238.
- Wong J., Higgins M., Halliday G., Garner B. (2012) Amyloid beta selectively modulates neuronal TrkB alternative transcript expression with implications for Alzheimer's disease. *Neuroscience* 210:363-374.
- Yamada M. K., Nakanishi K., Ohba S., Nakamura T., Ikegaya Y., Nishiyama N., Matsuki N. (2002) Brain-derived neurotrophic factor promotes the maturation of GABAergic mechanisms in cultured hippocampal neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 22:7580-7585.
- Yasar S., Corrada M., Brookmeyer R., Kawas C. (2005) Calcium channel blockers and risk of AD: the Baltimore Longitudinal Study of Aging. *Neurobiology of aging* 26:157-163.
- Yasutake C., Kuroda K., Yanagawa T., Okamura T., Yoneda H. (2006) Serum BDNF, TNF-alpha and IL-1beta levels in dementia patients: comparison between Alzheimer's disease and vascular dementia. *European archives of psychiatry and clinical neuroscience* 256:402-406.
- Ying S. Y., Chang C. P., Lin S. L. (2010) Intron-mediated RNA interference, intronic microRNAs, and applications. *Methods in molecular biology* 629:205-237.
- Yoshida T., Ishikawa M., Niitsu T., Nakazato M., Watanabe H., Shiraishi T., Shiina A., Hashimoto T., Kanahara N., Hasegawa T., i sur. (2012) Decreased serum levels of mature brain-derived neurotrophic factor (BDNF), but not its precursor proBDNF, in patients with major depressive disorder. *PLoS one* 7:e42676.
- Yoshii A., Constantine-Paton M. (2007) BDNF induces transport of PSD-95 to dendrites through PI3K-AKT signaling after NMDA receptor activation. *Nature neuroscience* 10:702-711.
- Yoshii A., Constantine-Paton M. (2010) Postsynaptic BDNF-TrkB signaling in synapse maturation, plasticity, and disease. *Developmental neurobiology* 70:304-322.

- Yu H., Zhang Z., Shi Y., Bai F., Xie C., Qian Y., Yuan Y., Deng L. (2008) Association study of the decreased serum BDNF concentrations in amnesic mild cognitive impairment and the Val66Met polymorphism in Chinese Han. *The Journal of clinical psychiatry* 69:1104-1111.
- Zagrebelsky M., Holz A., Dechant G., Barde Y. A., Bonhoeffer T., Korte M. (2005) The p75 neurotrophin receptor negatively modulates dendrite complexity and spine density in hippocampal neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 25:9989-9999.
- Zandi P. P., Anthony J. C., Khachaturian A. S., Stone S. V., Gustafson D., Tschanz J. T., Norton M. C., Welsh-Bohmer K. A., Breitner J. C., Cache County Study G. (2004) Reduced risk of Alzheimer disease in users of antioxidant vitamin supplements: the Cache County Study. *Archives of neurology* 61:82-88.
- Zaudig M. (2000) A risk-benefit assessment of risperidone for the treatment of behavioural and psychological symptoms in dementia. *Drug Saf* 23:183-195.
- Zdanys K. F., Kleiman T. G., MacAvoy M. G., Black B. T., Rightmer T. E., Grey M., Garman K. S., Tampi R. R., Gelernter J., van Dyck C. H. (2007) Apolipoprotein E epsilon4 allele increases risk for psychotic symptoms in Alzheimer's disease. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 32:171-179.
- Zhang H., Ozbay F., Lappalainen J., Kranzler H. R., van Dyck C. H., Charney D. S., Price L. H., Southwick S., Yang B. Z., Rasmussen A., i sur. (2006) Brain derived neurotrophic factor (BDNF) gene variants and Alzheimer's disease, affective disorders, posttraumatic stress disorder, schizophrenia, and substance dependence. *American journal of medical genetics Part B, Neuropsychiatric genetics : the official publication of the International Society of Psychiatric Genetics* 141B:387-393.
- Zhang X. Y., Tan Y. L., Zhou D. F., Cao L. Y., Wu G. Y., Xu Q., Shen Y., Haile C. N., Kosten T. A., Kosten T. R. (2007) Serum BDNF levels and weight gain in schizophrenic patients on long-term treatment with antipsychotics. *Journal of psychiatric research* 41:997-1004.
- Zhao Z., Ho L., Wang J., Qin W., Festa E. D., Mobbs C., Hof P., Rocher A., Masur S., Haroutunian V., i sur. (2005) Connective tissue growth factor (CTGF) expression in the brain is a downstream effector of insulin resistance- associated promotion of Alzheimer's disease beta-amyloid neuropathology. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 19:2081-2082.
- Ziegenhorn A. A., Schulte-Herbruggen O., Danker-Hopfe H., Malbranc M., Hartung H. D., Anders D., Lang U. E., Steinhagen-Thiessen E., Schaub R. T., Hellweg R. (2007) Serum neurotrophins--a study on the time course and influencing factors in a large old age sample. *Neurobiology of aging* 28:1436-1445.

SAŽETAK

Ovo istraživanje daje bolji uvid u ulogu moždanog neurotrofnog čimbenika (BDNF) u demenciji, točnije u ulogu ovog neurotrofina u razvoju kognitivnih te bihevioralnih i psiholoških simptoma demencije (BPSD), sa svrhom da ponudi nove lako dostupne biokemijske i genetičke pokazatelje spomenutih simptoma demencije i dodatno doprinese novim spoznajama u razumijevanju i liječenju istih. U ovoj studiji istraživana je uloga pet polimorfizama gena BDNF (rs6264, rs11030104, rs7934165, rs1519480, rs56164415) i jednog polimorfizma, rs1439050, gena za tropomiozin-receptor-kinazu B (TrkB) te uloga koncentracije proteina BDNF u plazmi u razvoju demencije i pojedinih simptomima ove bolesti. Također, analizirana je i razlika u ekspresiji gena BDNF i gena za unutarstanični sortirajući receptor prekursora proteina amiloid- β (SORL1) između pacijenata kojima je dijagnosticirana Alzheimerova bolest (AB) i onih koji imaju dijagnozu blagog kognitivnog (spoznajnog) poremećaja (MCI). Rezultati ovog rada upućuju na povećanu koncentraciju proteina BDNF u plazmi osoba s dijagnozom AB-a u odnosu na ispitanike s dijagnozom MCI-a i u odnosu na pacijente s dijagnozom ostalih tipova demencije. Istraživanje upućuje i na pozitivnu korelaciju između koncentracije proteina BDNF i broja bodova na testu crtanja sata (CDT) kod skupine ispitanika s dijagnozom demencija drugog tipa. Rezultati su potvrdili ulogu BDNF-a u razvoju BPSD-a, točnije, potvrdili su pozitivnu korelaciju između koncentracije proteina BDNF u plazmi i simptoma anksioznosti, poremećaja spavanja i noćnog nemira te poremećaja prehrane i apetita. U slučaju polimorfizma rs1439050 pronađena je značajna razlika u raspodjeli genotipova između ispitanika podijeljenih u kategorije prema broju bodova na testu procjene mentalnog stanja i testu CDT. Značajna razlika u broju bodova na testu CDT pronađena je kod osoba s dijagnozom AB-a nakon podijele prema genotipu s obzirom na polimorfizam rs1103014 gena BDNF. Pronađena je značajna razlika u distribuciji genotipova s obzirom na polimorfizam rs1519480 gena BDNF između svih uspoređenih skupina, podijeljenih prema broju bodova na skali za rangiranje demencije. U slučaju bodova na testu CDT, rezultat upućuje na to da je zadani model višestruke linearne regresije u slučaju haplotipa H1 (AGTCA) zaslužan za 3,5% varijacije u broju CDT bodova. Slično je pokazano i za haplotip H6 (AGTCG) gdje je model višestruke linearne regresije zaslužan za 11,2% varijacije koja je vidljiva na skali procjene Alzheimerove bolesti - kognitivna podskala. Rezultati su pokazali da postoji značajna razlika u broju bodova vezanih za simptome deluzija i apatije/ravnodušnosti između nosioca i ne-nosioca haplotipa H1, nakon korekcije za mogući utjecaj spola i dobi. U slučaju haplotipa H3 (GGTCG) pronađena je značajna razlika u broju bodova vezanih za simptome poremećaja spavanja i noćni nemir. Usporedba nosioca i ne-nosioca haplotipa H6 pokazala je da postoji značajna razlika između ovih skupina u broju bodova na domeni koja se odnosi na apatiju/ravnodušnost. U sklopu istraživanja pokazano je da nema značajnog utjecaja istraživanih polimorfizama i haplotipova na vrijednosti koncentracije proteina BDNF u plazmi. Analiza mRNA ekspresije napravljena je na manjem broju ispitanika, a rezultati su pokazali da nema značajne razlike u ekspresiji gena BDNF i gena SORL1 između ispitanika s AB-om i ispitanika s dijagnozom MCI-a, ali je u slučaju gena BDNF vidljiv trend koji upućuje na smanjenu razinu ekspresije u perifernim mononuklearnim stanicama krvi ispitanika u kasnoj fazi AB-a u odnosu na osobe s dijagnozom MCI-a.

SUMMARY

This research provides a better insight into the role of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in dementia, particularly its role in the development of cognitive, behavioral and psychological symptoms of dementia (BPSD), with the purpose to offer the new and easily accessible biochemical and genetic indicators of such symptoms in dementia and to provide new insights that will help us to better understand and treat these symptoms. This study investigated the role of the five BDNF gene polymorphisms (rs6264, rs11030104, rs7934165, rs1519480, rs56164415) and one tropomyosin-receptor-kinase B (TrkB) gene polymorphism (rs1439050), and the role of plasma BDNF concentration in the development of dementia and certain symptoms of the disease. A comparison of differences in the gene expression profiles of BDNF and sortilin-related receptor, L (DLR class) A repeats containing (SORL1) among patients diagnosed with Alzheimer's disease (AD) and those with diagnosis of mild cognitive impairment (MCI). The results of this study indicate increased BDNF concentration in plasma from patients with AD compared to subjects with MCI or with other types of dementia. The research also points to the positive correlation between plasma BDNF concentration and the total score on the clock-drawing test (CDT) in a group of patients diagnosed with non-AD dementia. The results confirmed the role of BDNF in the development of BPSD as they confirmed a positive correlation between BDNF plasma levels and symptoms of anxiety, sleep disorders and nocturnal restlessness, appetite distress and eating disorders. A significant difference in the genotype distribution between subjects divided into categories according to the score on minimal state examination and CDT was detected in the case of rs1439050 polymorphism. A significant difference was found in the genotype distribution, according to the rs1103014 polymorphism, in the group of patients with AD, divided according to the CDT score. We found a significant difference in the genotype distribution of the BDNF rs1519480 polymorphism among all groups, divided according to the clinical dementia rating score. Multiple linear regression model, that included the effect of BDNF H1 haplotype (AGTC), explained 3.5% of the variation in the CDT score. A similar effect was found in the case of H6 haplotype (AGTCG) where multiple linear regression model explained 11.2% of the variation in the score according to the Alzheimer's Disease Assessment Scale - cognitive subscale. The results showed that there is a significant difference in the severity of symptoms of delusions and apathy/indifference between H1 carriers and non-carriers, after correcting for the possible influence of gender and age. A significant difference was detected in the case of H3 haplotype (GGTCG) related to the severity of symptoms of sleep disorders and nocturnal restlessness. Comparison of H6 carriers and non-carriers showed that there is a significant difference between these groups according to the severity of symptoms of apathy/indifference. The research showed that there was no significant effect of the investigated polymorphisms and haplotypes on the BDNF plasma levels. Analysis of mRNA expression was done using a small group of subjects, and the results showed no significant differences in gene expression of BDNF and SORL1 between subjects in the late stage of AD and patients with MCI. However, there was a non-significant trend to the increased BDNF gene expression in peripheral blood mononuclear cells of patients with AD compared to the individuals with MCI.

POPIS KRATICA

5-HT	Serotonin
AB	Alzheimerova bolest
Ach	Acetilolin
ADAS-Cog	Skala procjene Alzheimerove bolesti - kognitivna podsкала
AICD	Unutarstanična domena proteina APP
ANOVA	Analiza varijance
Apo	Apolipoprotein
APP	Prekursor proteina amiloid- β
A β	Amiloid- β
BDNF	Moždani neurotrofni čimbenik
mBDNF	Zreli BDNF
proBDNF	Nezreli oblik BDNF-a
BEHAVE-AD	Skala za procjenu bihevioralne patologije u Alzheimerovoj bolesti
BPSD	Bihevioralni i psihološki simptomi demencije
BSA	Goveđi serumski albumin
CDR	Klinička skala za rangiranje demencije
CDT	Test crtanja sata
COMT	Katehol-O-metiltransferaza
CREB	CRE-vezujući protein
CST	Cerebrospinalna tekućina
CT	Računalna tomografija
DA	Dopamin
DAT1	Dopaminski transporter
DLB	Bolest Lewyjevih tjelešaca
DNA	Deoksiribonukleinska kiselina
cDNA	Komplementarna DNA
DRD	Dopaminski receptor
DSM-IV	Dijagnostički i statistički priručnik mentalnih poremećaja, 4. izdanje
ELISA	Enzimski povezana imunoapsorpcijska analiza
ER	Endoplazmatski retikulum

ERK	Ekstracelularnim signalom regulirane kinaze
FTD	Frontotemporalna demencija
GA	Golgijev aparat
GABA	Gama-aminomaslačna kiselina
IL	Interleukin
LD	Neravnoteža udruživanja alela
LTD	Proces dugoročne depresije
LTP	Proces dugoročnog potenciranja
MAPK	Mitogenom-aktivirane proteinske kinaze
MCI	Blagi kognitivni (spoznajni) poremećaj
Met	Metionin
MKB-10	Međunarodna klasifikacija bolesti, 10. revizija
MMSE	Test procjene mentalnog stanja
MRI	Magnetska rezonancija
NA	Noradrenalin
NGF	Čimbenik rasta živaca
NINCDS-ADRDA	Kriteriji Nacionalnog instituta za neurološke i komunikacijske poremećaje te moždani udar - Asocijacija za Alzheimerovu bolest i srodne poremećaje
NMDA	N-metil-D-aspartat
NPI	Neuropsihijatrijski inventar
NT	Neurotrofin
dNTP	Deoksiribonukleotidi
p75NTR	Pan neurotrofinski receptor
PB	Parkinsonova bolest
PET	Pozitronska emisijska tomografija
PI3K	Fosfatidilinozitol 3-kinaza
PLC γ	Fosfolipaza C gama
PSEN	Presenilin
RCLB	Pufer za lizu eritrocita
PCR	Lančana reakcija polimeraze

RT-PCR	Reverzna transkripcija s lančanom reakcijom polimeraze
RNA	Ribonukleinska kiselina
mRNA	Glasnička RNA
RNaza	Enzim ribonukleaza
SNP	Polimorfizam jednog nukleotida
SŽS	Središnji živčani sustav
p-tau	Fosforilirani tau
t-tau	Ukupni tau
TGN	Trans-Golgijska mreža
Trk	Tropomiozin-receptor-kinaza
VaD	Vaskularna demencija
Val	Valin

ŽIVOTOPIS

Osnovni podaci

Osobni podaci

Ime i prezime: **Matea Nikolac Perković**
Datum i mjesto rođenja: 08. travnja 1984., Zagreb
Adresa: Selska cesta 90F, Zagreb
Narodnost/Državljanstvo: Hrvatica/Hrvatsko
Bračni status: udana, jedno dijete
Telefon: 098/9437343
E-mail: mnikolac@irb.hr

Obrazovanje

2010 - danas Sveučilišni poslijediplomski interdisciplinarni doktorski studij
Molekularne bioznanosti, Sveučilište u Osijeku
2002 -2008 Prirodoslovno matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu
1998 -2002 "2. opća gimnazija", Zagreb

Radno iskustvo

2009 - danas Institut „Ruđer Bošković“, Zagreb; znanstveni novak - asistent

Osobne vještine i kompeticije

Jezici: Hrvatski (materinji jezik)
Engleski, Talijanski, Francuski (strani jezici)
Rad na računalu: Odlično znanje programskog paketa Microsoft Office, programa Photoshop i EndNote, te programa za statističku obradu podataka (SigmaStat, MedCalc, SPSS, Gpower).
Vozačka dozvola: B kategorija

Znanstvena djelatnost

Članstva u organizacijama

Hrvatsko društvo farmakologa
 Hrvatsko društvo za neuroznanost
 International Brain Research Organization
 Federation of European Neuroscience Societies
 European Pharmacological Society
 International Union of Pharmacological Society

Nagrade i priznanja

Nagrada Društva sveučilišnih nastavnika i drugih znanstvenika u Zagrebu mladim znanstvenicima i umjetnicima za 2013. god.
 Državna nagrada za znanost za 2013. god. - Godišnja nagrada znanstvenim novcima

Sudjelovanja na projektima

2007 - 2015	Molekularna podloga i liječenje psihijatrijskih i stresom izazvanih poremećaja; MZOŠ; voditelj Nela Pivac
2009 - 2010	Genetički čimbenici kao pokazatelji suicida, Hrvatsko-Slovenski bilateralni projekt; MZOŠ, voditelji Nela Pivac i Peter Pregelj
2011 - danas	Structure-based drug design for diagnosis and treatment of neurological diseases: dissecting and modulating complex function in the monoaminergic systems of the brain; COST; predstavnik za RH Nela Pivac
2011 - 2015	Otkrivanje i praćenje bioloških biljega radi rane terapijske intervencije u Alzheimerovoj bolesti; HRZZ; voditelj Goran Šimić
2013 - danas	The association between stress, genetic variants of the catechol-O-methyltransferase and mu opioid receptor gene polymorphisms and tobacco smoking in patients with schizophrenia; projekt između Sveučilišta Michigan (SAD), Instituta Ruđer Bošković i Klinike za psihijatriju Vrapče; voditelji Nela Pivac i Ed Domino
2014 - 2015	The role of 5-HT ₆ receptors in Alzheimer's disease, Hrvatsko-Slovenski bilateralni projekt; MZOŠ; Voditelji Suzana Uzun i Zvezdan Pirtovsek
2015-2018:	Multidisciplinary Metrics for Soldier Resilience Prediction and Training; NATO projekt (NATO Science for Peace and Security Programme; direktor: Kresimir Cosic (Hrvatska); ko-direktori: Omer Bonne (Israel), Nela Pivac (Hrvatska), Tanja Jovanovic (USA))

Znanstveni doprinos

Broj objavljenih radova:	24 (8 radova kao prvi autor ili autor jednakog doprinisa kao prvi)
Broj poglavlja u knjigama:	9
Broj citata:	153 (baza Scopus)
Prosječni čimbenik odjeka (IF):	3,392
H indeks:	7

Ispis svih znanstvenih publikacija iz CROSBİ baze

Matea Nikolac Perković (315511)

- Poglavlja u knjizi (9)
- Izvorni znanstveni i pregledni radovi u CC časopisima (22)
- Znanstveni radovi u drugim časopisima (2)
- Kongresna priopćenja (aktivno sudjelovanje na 5 kongresa ; 4 posterske prezentacije i jedna usmena):
 - Kongresno priopćenje (sažeci) u CC časopisu (1)
 - Kongresno priopćenje (sažeci) u ostalim časopisima (6)
 - Sažeci u zbornicima skupova (27)
 - Neobjavljena sudjelovanja na skupovima (1)
- Diplomski radovi (1)
- Druge vrste radova (1)
- Vođenje disertacija, magistarskih i diplomskih radova

Poglavlja u knjizi

1. Švob Štrac, Dubravka; **Nikolac Perković, Matea**; Nedić Erjavec, Gordana; Kiive, Evelyn; Dodig Čurković, Katarina; Čurkovic, Mario; Kocijan Hercigonja, Dubravka; Harro, Jaanus; Mück-Šeler, Dorotea; Pivac, Nela. Biomarkers of Impulsivity. Psychology of Impulsivity: New Research. Olmstead, C. Mary (ur.). New York : Nova Science Publishers, Inc., 2014. Str. 93-140.
2. Pivac, Nela; Nedić, Gordana; Kozarić-Kovačić, Dragica; **Nikolac, Matea**; Grubišić-Ilić, Mirjana; Mustapić, Maja; Jendričko, Tihana; Rakoš, Iva; Mück-Šeler, Dorotea. Biomarkers as new tools to improve the diagnosis and treatment of PTSD. New tools to enhance posttraumatic stress disorder diagnosis and treatment : invisible wounds of war. Wiederhold, Brenda K. (ur.). Amsterdam : IOS Press, 2013. Str. 21-74.
3. Švob Štrac, Dubravka; Mustapić, Maja; Šagud, Marina; Uzun, Suzana; Kozumplik, Oliver; Presečki, Paola; **Nikolac, Matea**; Mimica, Ninoslav; Nedić, Gordana; Mihaljević Peleš, Alma; Pavlović, Mladen; Marčinko, Darko; Pivac, Nela; Mück-Šeler, Dorotea. Lipid levels in neuropsychiatric disorders. Tryglicerides Chemical Structure, Biosynthesis and Role in Disease. Araujo, Calista; Perez, Demetrio (ur.). New York: NOVA Science Publisher, Inc., 2013. Str. 1-79.
4. Pivac, Nela; Nedić, Gordana; **Nikolac, Matea**; Fistonić, Marina; Kovačević, Marin; Mustapić, Maja; Gverić-Korkut, Ines; Grubišić-Ilić, Mirjana; Kozarić-Kovačić, Dragica; Mück-Šeler, Dorotea. Neurobiological basis of pain syndrome in war veterans with PTSD: preliminary findings. Pain Syndrome - From Recruitment to returning Troups. Wiederhold, Brenda K. (ur.). Amsterdam: IOS Press, 2012. Str. 94-122.
5. Pivac, Nela; Nedić, Gordana; **Nikolac, Matea**; Mustapić, Maja; Švob Štrac, Dubravka; Jazvinščak Jembrek, Maja; Mück-Šeler, Dorotea. Molecular mechanisms of traumatic brain injury. Traumatic brain injury. Wounds of war III. Wiederhold, Brenda K. (ur.). Amsterdam: IOS Press, 2011. Str. 81-111.

6. Mück-Šeler, Dorotea; Mustapić, Maja; Nedić, Gordana; Babić, Ana; Mimica, Ninoslav; Kozarić-Kovačić, Dragica; Nenadić-Šviglin, Korona; Stipčević, Tamara; Presečki, Paola; **Nikolac, Matea**; Borovečki, Fran; Folnegović Šmalc, Vera; Kovačić, Zrnka; Pivac, Nela. Genetic and biochemical markers of serotonergic and catecholaminergic systems in neuropsychiatric disorders. *Advances in Genetics Research*. Urbano, Kevin V. (ur.). New York: Nova Science Publishers, Inc, 2010. Str. 1-67.
7. Pivac, Nela; Kozarić-Kovačić, Dragica; Nedić, Gordana; **Nikolac, Matea**; Mustapić, Maja; Babić, Ana; Grubišić-Ilić, Mirjana; Kovačić, Zrnka; Mück-Šeler, Dorotea. Genetic markers in suicidal and non-suicidal veterans with combat-related posttraumatic stress disorder, Chapter 4. *Posttraumatic stress disorder (PTSD): causes, symptoms and treatment*. Egan, Sylvia J (ur.). New York: NOVA SCI Publisher, 2010. Str. 109-139.
8. Pivac, Nela; Nedić, Gordana; **Nikolac, Matea**; Nenadić-Šviglin, Korona; Kozarić-Kovačić, Dragica; Mustapić, Maja; Kovačić, Zrnka; Grubišić Ilić, Mirjana; Borovečki, Fran; Hajnšek, Sanja; Mück-Šeler, Dorotea. Sleep disturbances and serotonergic markers in psychiatric disorders. *Advances in Psychology Research*. Vol. 7. Columbus, Alexandra M. (ur.). New York: NOVA Science Publisher, 2010. Str. 1-85.
9. Pivac, Nela; **Nikolac, Matea**; Nedić, Gordana; Mück-Šeler, Dorotea. Genetics of suicidal behaviour. *Coping with posttraumatic stress disorder in returning troops. Wounds of war II*. Wiederhold, Brenda K. (ur.). Amsterdam: IOS Press, 2010. Str. 31-55.

Izvorni znanstveni i pregledni radovi u CC časopisima

1. Nedić Erjavec, Gordana; Nenadić Šviglin, Korona; **Nikolac Perković, Matea**; Mück-Šeler, Dorotea; Jovanović, Tanja; Pivac, Nela. Association of gene polymorphisms encoding dopaminergic system components and platelet MAO-B activity with alcohol dependence and alcohol dependence-related phenotypes. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 54 (2014): 321-327.
2. **Nikolac Perković, Matea**; Nedić Erjavec, Gordana; Živković, Maja; Šagud, Marina; Uzun, Suzana; Mihaljević-Peleš, Alma; Kozumplik, Oliver; Mück-Šeler, Dorotea; Pivac, Nela. Association between the brain-derived neurotrophic factor Val66Met polymorphism and therapeutic response to olanzapine in schizophrenia patients. *Psychopharmacology*. 231 (2014) ; 3757-3764.
3. Bortolato, Marco; Pivac, Nela; Mück-Šeler, Dorotea; **Nikolac Perkovic, Matea**; Pessia, Mauro; Di Giovanni, Giuseppe. The role of the serotonergic system at the interface of aggression and suicide. *Neuroscience* 236 (2013): 160-185.
4. Nedić, Gordana; **Nikolac Perković, Matea**; Nenadić Šviglin, Korona; Mück-Seler, Dorotea; Borovečki, Fran; Pivac, Nela. Brain-derived neurotrophic factor Val66Met polymorphism and alcohol-related phenotypes. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry* 40 (2013): 193-198.
5. **Nikolac Perković, Matea**; Kiive, Evelyn; Nedić Erjavec, Gordana; Veidebaum, Toomas; Čurković, Mario; Dodig-Čurković, Katarina; Mück-Šeler, Dorotea; Harro, Jaanus; Pivac, Nela. The association

between the catechol-O-methyltransferase Val108/158Met polymorphism and hyperactive-impulsive and inattentive symptoms in youth. *Psychopharmacology* 230 (2013): 69-76.

6. **Nikolac Perković, Matea**; Mustapić, Maja; Pavlović, Mladen; Uzun, Suzana; Kozumplik, Oliver; Barišić, Ivan; Mück-Šeler, Dorotea; Pivac, Nela. Lack of association between brain-derived neurotrophic factor Val66Met polymorphism and body mass index change over time in healthy adults. *Neuroscience letters* 545 (2013): 127-131.

7. **Nikolac Perković, Matea**; Nedić Erjavec, Gordana; Kocijan Hercigonja, Dubravka; Hranilović, Dubravka; Čurković, Mario; Štefulj, Jasminka; Dodig Čurković, Katarina; Mück-Šeler, Dorotea; Pivac, Nela. Association between the polymorphisms of the selected genes encoding dopaminergic system with ADHD and autism. *Psychiatry Research* (2013): 260-261.

8. **Nikolac Perković, Matea**; Pučić Baković, Maja; Kristić, Jasminka; Novokmet, Mislav; Huffman, Jennifer E.; Vitart, Veronique; Hayward, Caroline; Rudan, Igor; Wilson, James F.; Campbell, Harry; Polašek, Ozren; Lauc, Gordan, Pivac, Nela. The association between galactosylation of immunoglobulin G and body mass index. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 48 (2013): 20-25.

9. Živkovic, Maja; Mihaljević-Peleš, Alma; Božina, Nada; Šagud, Marina; **Nikolac Perković, Matea**; Vuksan-Čusa, Bjanka; Mück-Šeler, Dorotea. The Association Study of Polymorphisms in DAT, DRD2, and COMT Genes and Acute Extrapyrmidal Adverse Effects in Male Schizophrenic Patients Treated With Haloperidol. *Journal of Clinical Psychopharmacology* 33 (2013): 593-599.

10. **Nikolac, Matea**; Šagud, Marina; Nedić, Gordana; Nenadić Šviglin, Korona; Mihaljević Peleš, Alma; Uzun, Suzana; Vuskan Čusa, Bjanka; Kozumplik, Oliver; Živković, Maja; Mustapić, Maja; Jakovljević, Miro; Pavlović, Mladen; Mück-Šeler, Dorotea; Borovečki, Fran; Pivac, Nela. The lack of association between catechol-O-methyl-transferase Val108/158Met polymorphism and smoking in schizophrenia and alcohol dependence. *Psychiatry research* 205 (2013): 179-180.

11. Koršić, Mirko; Gotovac, Kristina; **Nikolac, Matea**; Dušek, Tina; Škegro, Mate; Mück-Šeler, Dorotea; Borovečki, Fran; Pivac, Nela. Gene expression in visceral and subcutaneous adipose tissue in overweight women. *Frontiers in Bioscience (Elite Ed.)* 4 (2012): 2834-2844.

12. Pivac, Nela; Kozarić-Kovačić, Dragica; Grubišić-Ilić, Mirjana; Nedić, Gordana; Rakoš, Iva; **Nikolac, Matea**; Blažev, Martina; Mück-Šeler, Dorotea. The association between brain-derived neurotrophic factor Val66Met variants and psychotic symptoms in posttraumatic stress disorder. *The world journal of biological psychiatry* 13 (2012): 306-311.

13. Šagud, Marina; **Nikolac, Matea**; Mihaljević-Peleš, Alma; Nedić, Gordana; Vuksan Čusa, Bjanka; Mustapić, Maja; Jakovljević, Miro; Mück-Šeler, Dorotea; Pivac, Nela. The lack of effect of ziprasidone on platelet serotonin concentration in schizophrenic patients, Letter to the Editors. *Psychopharmacology* 219 (2012): 1179-1181.

14. Škledar, Marijana; **Nikolac, Matea**; Dodig-Čurković, Katarina; Čurković, Mario; Borovečki, Fran; Pivac, Nela. Association between brain-derived neurotrophic factor Val66Met and obesity in children and adolescents. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry* 36 (2012): 136-140.

15. Nedić, Gordana; Borovečki, Fran; Klepac, Nataša; Mubrin, Zdenko; Hajnšek, Sanja; **Nikolac, Matea**; Mück-Šeler, Dorotea; Pivac, Nela. Association Study of a Functional Catechol-O-Methyltransferase Polymorphism and Cognitive Function in Patients with Dementia. *Collegium antropologicum* 45 (2011): 79-84.
16. Nedić, Gordana; **Nikolac, Matea**; Nenadić Šviglin, Korona; Mück-Šeler, Dorotea; Borovečki, Fran; Pivac, Nela. Association study of a functional catechol-O-methyltransferase (COMT) Val108/158Met polymorphism and suicide attempts in patients with alcohol dependence. *International journal of neuropsychopharmacology* 14 (2011): 377-388.
17. Nenadić-Šviglin, Korona; Nedić, Gordana; **Matea Nikolac, Matea**; Kozarić-Kovačić, Dragica; Stipčević, Tamara; Mück-Šeler, Dorotea; Pivac, Nela. Suicide attempts, comorbid depression and platelet serotonin in alcohol dependence. *Alcohol* 45 (2011): 209-216.
18. Nenadić Šviglin, Korona; Nedić, Gordana; **Nikolac, Matea**; Mustapić, Maja; Mück-Šeler, Dorotea; Borovečki, Fran; Pivac, Nela. Insomnia, platelet serotonin and platelet monoamine oxidase in chronic alcoholism. *Neuroscience letters* 500 (2011): 172-176.
19. Pivac, Nela; Knežević, Ana; Gornik, Olga; Pučić, Maja; Igl, Wilmar; Peeters, Hilde; Crepel, An; Steyaert, Jean; Novokmet, Mislav; Redžić, Irma; **Nikolac, Matea**; Novković Hercigonja, Vesna; Dodig Ćurković, Katarina; Ćurković, Mario; Nedić, Gordana; Mück-Šeler, Dorotea; Borovečki, Fran; Rudan, Igor; Lauc, Gordan. Human plasma glycome in attention-deficit hyperactivity disorder and autism spectrum disorders. *Molecular & cellular proteomics* 10 (2011): 1-7.
20. Pivac, Nela; **Nikolac, Matea**; Nedić, Gordana; Mustapić, Maja; Borovečki, Fran; Hajnšek, Sanja; Presečki, Paola; Pavlović, Mladen; Mimica, Ninoslav; Mück-Šeler, Dorotea. Brain derived neurotrophic factor Val66Met polymorphism and psychotic symptoms in Alzheimer's disease. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry* 35 (2011): 356-362.
21. Pregelj, Peter; Nedić, Gordana; Videtič Paska, Alja; Zupanc, Tomaž; **Nikolac, Matea**; Balažić, Jože; Tomori, Martina; Komel, Radovan; Mück Šeler, Dorotea; Pivac, Nela. The association between brain-derived neurotrophic factor polymorphism (BDNF Val66Met) and suicide. *Journal of affective disorders* 128 (2011): 287-290.
22. Nedić, Gordana; **Nikolac, Matea**; Borovečki, Fran; Hajnšek, Sanja; Mück-Šeler, Dorotea; Pivac, Nela. Association study of a functional catechol-o-methyltransferase polymorphism and smoking in healthy Caucasian subjects. *Neuroscience letters* 473 (2010): 216-219.

Znanstveni radovi u drugim časopisima

1. Šagud, Marina; **Nikolac, Matea**; Mihaljević-Peješ, Alma; Nedić, Gordana; Vuksan Čusa, Bjanka; Mustapić, Maja; Marčinko, Darko; Jakovljević, Miro; Mück-Šeler, Dorotea; Pivac, Nela. Antipsychotic drugs do not affect platelet 5-HT concentration in schizophrenic patients. *Translational neuroscience* 3 (2012): 56-60.
2. Pivac, Nela; Pregelj, Peter; **Nikolac, Matea**; Zupanc, Tomož; Nedić, Gordana; Mück-Šeler, Dorotea; Videtič Paska, Alja. The association between catechol-O-methyl-transferase Val108/158Met polymorphism and suicide. *Genes, Brain and Behavior* 10 (2011): 565-569.

Kongresno priopćenje (sažeci) u CC časopisu

1. Dodig-Ćurković, Katarina; Ćurković, Mario; **Nikolac, Matea**; Nedić, Gordana; Mück-Šeler, Dorotea; Pivac, Nela. The lack of association between catechol-O-methyl-transferase Val108/158Met polymorphism and aggressive behaviour in adolescents // European Neuropsychopharmacology 21 (Suppl. 3) / van Ree, JM; Montgomery, SA (ur.). Amsterdam: Elsevier, 2011. S802-S803.

Kongresno priopćenje (sažeci) u ostalim časopisima

1. Nenadić-Šviglin, Korona; Nikolac Perković, Matea; Mück-Šeler, Dorotea; Pivac, Nela. Comparison of the use of hypnotics and benzodiazepines in patients with alcohol dependence with or without sleep disturbances // Periodicum Biologorum / Vitale, Branko (ur.). Zagreb: LASERplus, 2013. 61-61.

2. Švob Štrac, Dubravka; Nedić, Gordana; **Nikolac, Matea**; Nenadić Šviglin, Korona; Mück-Šeler, Dorotea; Pivac, Nela. The GABA-A receptor alpha2 subunit gene (GABRA2) is associated with alcohol-related behavior // BMC Pharmacology and Toxicology, Vol 13 (Supp 1) / Holzer, Peter; Griesbacher, Thomas (ur.). Graz, Austria, 2012. A8-A8.

3. Nedić, Gordana; Hercigonja-Novković, Vesna; Dodig-Ćurković, Katarina; Ćurković, Mario; Škledar, Marijana; **Nikolac, Matea**; Mück-Šeler, Dorotea; Pivac, Nela. Dopaminergic mechanisms in attention deficit hyperactivity disorders in children // Periodicum Biologorum, vol 112, Suppl. 1 / Vitale, Branko (ur.). Zagreb: Hrvatsko prirodoslovno društvo, Institut Ruđer Bošković, Laserplus, 2010. 34-34.

4. **Nikolac, Matea**; Hercigonja Novković, Vesna; Dodig-Ćurković, Katarina; Ćurković, Mario; Nedić, Gordana; Mück-Šeler, Dorotea; Lauc, Gordan; Pivac, Nela. Association of attention-deficit/hyperactivity disorder symptoms with the solute carrier family (sodium/hydrogen exchanger) isoform 9 (SLC9A9) // Periodicum Biologorum Vol 112, Suppl. 1 / Vitale, Branko (ur.). Zagreb: Hrvatsko prirodoslovno društvo, Institut Ruđer Bošković, Laserplus, 2010. 123-124.

5. Pivac, Nela; **Nikolac, Matea**; Nedić, Gordana; Dodig-Ćurković, Katarina; Ćurković, Mario; Škledar, Marijana; Mück-Šeler, Dorotea. Molecular markers of behavioral and emotional disorders // Periodicum Biologorum, vol 112, Suppl. 1 / Vitale, Branko (ur.). Zagreb: Hrvatsko prirodoslovno društvo, Institut Ruđer Bošković, Laserplus, 2010. 31-31.

6. Pivac, Nela; **Nikolac, Matea**, Nedić, Gordana; Mustapić, Maja; Borovečki, Fran; Presečki, Paola; Hajnšek, Sanja; Mimica, Ninoslav; Mück-Seler, Dorotea. Genetic analysis of the brain derived neurotrophic factor Val66Met polymorphism in Alzheimer's disease // Neurologia Croatica / Šimić, Goran; Mimica, Ninoslav (ur.). Zagreb, 2010. 18-18.

Sažeci u zbornicima skupova

1. Nedic Erjavec, Gordana; **Nikolac Perkovic, Matea**; Mück-Seler, Dorotea; Pivac, Nela. Guidelines for therapy of Alzheimer's disease // Neurologia Croatica.
2. Kuzman, Boris; Morić, Marina; Nedić Erjavec, Gordana, **Nikolac Perković, Matea**; Nenadić Šviglin, Korona; Borovečki, Fran; Mück-Šeler, Dorotea; Pivac, Nela; Švob Štrac, Dubravka. The association of Ser310Ala functional polymorphism in the GluR7 glutamate receptor subunit gene with the age of onset of alcohol abuse in alcohol-dependent patients // Abstract book NeuRi 2014 ; 4th Student Congress of Neuroscience, April 25th–27th, 2014, Rijeka , Rab / Omrčen, Hrvoje ; Fotak, Luka (ur.). Rijeka : Printex, Čakovec, 2014. 79-79.
3. **Nikolac Perković, Matea**; Borovečki, Fran; Filipčić, Igor; Klepac, Nataša; Hajnšek, Sanja; Mück-Šeler, Dorotea; Pivac, Nela. BDNF plasma levels and cognitive function in patients with alzheimer's disease and mild cognitive impairment // Neurologia Croatica / Šimić, Goran ; Mimica, Ninoslav (ur.). Zagreb : Denona d.o.o., 2014. 34-34.
4. Šimić, Goran; Babić, Mirjana; Bažadona, Danira; Borovečki, Fran; Čerimagić, Denis; Dejanović, Nenad; Hajnšek, Sanja; Henigsberg, Neven; Jazvinščak-Jembrek, Maja; Jovanov-Milošević, Nataša; Kalanj-Bognar, Svjetlana; Kiđemet-Piskaš, Spomenka; Mustapić, Maja; Mimica, Ninoslav; Mück-Šeler, Dorotea; Nedić-Erjavec, Gordana; **Nikolac Perković, Matea**; Petrović, Ratimir; Pivac, Nela; Presečki, Paola; Radoš, Milan; Stanić, Gabrijela; Švob Štrac, Dubravka; Vogrinc, Željka; Vukelić, Željka; Hof, Patrick R. Early diagnosis of Alzheimer's disease by combination of cerebrospinal fluid core biomarkers and visinin-like protein-1 (VILIP-1) // The 2014 Alzheimer's disease congress / The 2014 Alzheimer's disease congress (ur.). London : Euroscicon Ltd UK, 2014. 8-9.
5. Kuzman, Boris; Moric, Marina; Nedic Erjavec, Gordana; **Nikolac Perkovic, Matea**; Nenadic Sviglin, Korona; Borovecki, Fran; Mück-Seler, Dorotea; Pivac, Nela; Svob Strac, Dubravka. The association of GRIK3 polymorphism with alcoholism in the subjects of Croatian origin // Book of abstracts, 4.Croatian Congress of Neuroscience, Zagreb, Croatia, September 20-21, 2013 / Croatian Society for Neuroscience, Croatian Institute for Brain Research (ur.). Zagreb: Croatian Society for Neuroscience, Croatian Institute for Brain Research, 2013. 29-29.
6. Kuzman, Boris; Morić, Marina; Nedić Erjavec, Gordana; **Nikolac Perković, Matea**; Nenadić Šviglin, Korona; Mück-Šeler, Dorotea; Pivac, Nela; Švob Štrac, Dubravka. Ser310Ala functional polymorphism in the GluR7 glutamate receptor subunit gene and alcohol dependence // Book of abstracts / SiNAPSA Neuroscience Conference '13, Ljubljana, Slovenia, September 27-29, 2013 / Jeran, Judita; Koritnik, Blaž (ur.). Ljubljana: SiNAPSA, Slovenian Neuroscience Association, 2013. 90-90.
7. Nedic Erjavec, Gordana; Nenadic Sviglin, Korona; **Nikolac Perkovic, Matea**; Mück-Seler, Dorotea; Pivac, Nela. Association of variable number of tandem repeats polymorphism in the third exon of DRD4 gene and catechol- O-methyltransferase Val108/158Met polymorphism with alcoholism and alcohol-related phenotypes // SiNAPSA Neuroscience Conference '13 Book of abstracts / Jeran, Judita; Koritnik, Blaž (ur.). Ljubljana: SiNAPSA, Slovenian Neuroscience Association, 2013. 87-87.
8. Nedic Erjavec, Gordana; Nenadic Sviglin, Korona; **Nikolac Perkovic, Matea**; Mück-Seler, Dorotea; Pivac, Nela. Genetic variants of the dopaminergic system and alcohol dependence and

alcohol abuse-related phenotypes // 4. Croatian Congress of Neuroscience Book of abstracts. Zagreb, 2013. 37-37.

9. Nenadić-Šviglin, Korona; **Nikolac Perković, Matea**; Mück-Šeler, Dorotea; Pivac, Nela. Comparison of the use of hypnotics and benzodiazepines in patients with alcohol dependence with or without sleep disturbances // *Periodicum biologorum*, Vol 115, Suppl 3. Zagreb: Croatian Society for Natural Sciences, Ruđer Bošković Institute, LASERplus, 2013. 61-61.

10. **Nikolac Perković, Matea**; Borovečki, Fran; Klepac, Nataša; Hajnšek, Sanja; Mück-Šeler, Dorotea; Pivac, Nela. The association of BDNF polymorphisms and cognitive function in patients with Alzheimer's disease and mild cognitive impairment // *SiNAPSA Neuroscience Conference '13 Book of Abstracts / Jeran, Judita; Koritnik, Blaž (ur.)*. Ljubljana: SiNAPSA, Slovenian Neuroscience Association, 2013. 67-67.

11. **Nikolac Perković, Matea**; Borovečki, Fran; Klepac, Nataša; Hajnšek, Sanja; Mück-Šeler, Dorotea; Pivac, Nela. Polymorphisms of the brain-derived neurotrophic factor and cognitive impairment in patients with Alzheimer's disease and mild cognitive impairment // *4th Croatian Congress of Neuroscience Book of Abstracts*. Zagreb: Croatian Society for Neuroscience, 2013. 56-56.

12. Pivac, Nela; **Nikolac Perković, Matea**; Nedić Erjavec, Gordana; Šagud, Marina; Uzun, Suzana; Živkovic, Maja; Kozumplik, Oliver; Mihaljević-Peješ, Alma; Vuksan-Čusa, Bjanka; Mück-Šeler, Dorotea. The association of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) Val66Met or catechol-o-methyltransferase (COMT) Val158Met polymorphism with antipsychotic-induced treatment response in schizophrenic patients // *Thematic meeting Jerusalem CINP2013: Pharmacogenomics and Personalized Medicine in Psychiatry Programme / Beimaker, Robert H; Lerer, Bernard (ur.)*. Jerusalem: CINP, 2013 Beimaker Robert H. 37-37.

13. Svob Strac, Dubravka; Nedic Erjavec, Gordana; **Nikolac Perkovic, Matea**; Nenadic Sviglin, Korona; Mück-Seler, Dorotea; Pivac, Nela. The association of GABA-A receptor alpha2 subunit gene (GABRA2) with alcohol-related suicidal behaviour // *Book of abstracts, 4. Croatian Congress of Neuroscience, Zagreb, Croatia, September 20- 21, 2013 / Croatian Society for Neuroscience, Croatian Institute for Brain Research (ur.)*. Zagreb: Croatian Society for Neuroscience, Croatian Institute for Brain Research, 2013. 30-30.

14. Nenadić-Šviglin, Korona; Nedić, Gordana; **Nikolac, Matea**; Mück-Šeler, Dorotea; Pivac, Nela. Sex differences in the use of hypnotics and benzodiazepines in patients with alcohol dependence and insomnia // *Proceedings of the British Pharmacological Society at <http://www.pA2online.org/abstracts/Vol10Issue3abst184P.pdf>*.

15. Pivac, Nela; **Nikolac, Matea**; Uzun, Suzana; Nedić, Gordana; Kozumplik, Oliver; Mück-Šeler, Dorotea. The association between COMT Val158Met and BDNF Val66Met genotypes and antipsychotic induced side effects // *Proceedings of the British Pharmacological Society at <http://www.pA2online.org/abstracts/Vol10Issue3abst189P.pdf>*.

16. Pivac, Nela; Borovečki, Fran; **Nikolac, Matea**; Mück-Šeler, Dorotea; Koršić, Mirko. Što je novo u genetici debljine (razlike između supkutanog i visceralnog masnog tkiva) // *Knjiga sažetaka 5. hrvatskog kongresa o debljini s međunarodnim sudjelovanjem / Koršić, Mirko; (ur.)*. Zagreb: Hrvatsko društvo za debljinu, Hrvatski liječnički zbor, 2012. 49-50.

17. Pivac, Nela; **Nikolac, Matea**; Uzun, Suzana; Nedić, Gordana; Kozumplik, Oliver; Mück-Šeler, Dorotea. Farmakogenetika nuspojava antipsihotika // Zbornik sažetaka Hrvatske škole kreativne psihofarmakoterapije i 4. hrvatskog kongresa o nuspojavama psihofarmaka / Uzun, Suzana ; Kozumplik, Oliver; Jakovljević, Miro (ur.). Osijek: Hrvatsko društvo za psihofarmakoterapiju i biološku psihijatriju, 2012. 42-45.

18. Šimić, Goran; Babić, Mirjana; Bažadona, Danira; Borovečki, Fran; Hajnšek, Sanja; Henigsberg, Neven; Jazvinščak-Jembrek, Maja; Jovanov-Milošević, Nataša; Kalanj-Bognar, Svjetlana; Mustapić, Maja; Mimica, Ninoslav; Mück-Šeler, Dorotea; Nedić, Gordana; **Nikolac, Matea**; Petrović, Ratimir; Pivac, Nela; Presečki, Paola; Radoš, Milan; Stanić, Gabrijela; Švob-Štrac, Dubravka; Vukelić, Željka; Hof, Patrick. Croatian project on early detection of Alzheimer's disease: Preliminary findings // FENS Abstract, Volume 6, p013.31, 2012 / FENS (ur.). Barcelona: FENS, 2012. 31-31.

19. **Nikolac, Matea**; Hercigonja Novković, Vesna; Čurković, Mario; Mück-Šeler, Dorotea; Pivac, Nela. The association between catechol-O-methyltransferase gene variants and childhood attention deficit hyperactivity disorder // Journal of neurochemistry, Special Issue: 23rd Biennial Meeting of ISN/ESN, Athens, Greece, 28 August - 1 September 2011, vol 118, Suppl. 1 / Murphy S, Schulz J (ur.). Geneva : International society for neurochemistry, 2011. 222-222.

20. Pivac, Nela; Nedić, Gordana; **Nikolac, Matea**; Fistonić, Marina; Kovačević, Marin; Mustapić, Maja; Gverić Korkut, Ines; Grubišić-Ilić, Mirjana; Kozarić-Kovačić, Dragica; Mück-Šeler, Dorotea. Neurobiological Basis of Pain Syndrome in War Veterans with PTSD: Preliminary Findings // Book of abstracts of the NATO Advanced Research Workshop: Wounds of war IV: Pain syndromes - from recruitment to returning troops / Wiederhold, Brenda K (ur.). San Diego: Interactive Media Institute, 2011. 21-22.

21. Pivac, Nela; Uzun, Suzana; **Nikolac, Matea**; Kozumplik, Oliver; Nedić, Gordana; Mustapić, Maja; Jakovljević, Miro; Mück-Šeler, Dorotea. Val108/158Met polimorfizam katehol-o-metil-transferaze, shizofrenija i metabolički sindrom // Konačni program i zbornik sažetaka 3. hrvatskog kongresa o nuspojavama psihofarmaka / Uzun, Suzana; Kozumplik, Oliver; Jakovljević, Miro (ur.). Zagreb, 2011. 62-62.

22. Švob Štrac, Dubravka; Nedić, Gordana; **Nikolac, Matea**; Nenadić Šviglin, Korona; Mustapić, Maja; Mück-Šeler Dorotea; Pivac, Nela. The lack of association of GABRA2 polymorphism and alcohol dependence in Croatian population // Book of abstracts/SiNAPSA Neuroscience Conference 11 / Osredkar, Damjan; Koritnik, Blaž; Pelko, Miha (ur.). Ljubljana, Slovenia: SiNAPSA, Slovenian Neuroscience Association, 2011. 149-149.

23. Mück-Šeler, Dorotea; Mustapić, Maja; Nenadić-Šviglin, Korona; Babić, Ana; Nedić, Gordana; **Nikolac, Matea**; Pivac, Nela. Is the polymorphism in the serotonin type 1B receptor gene associated with alcohol dependence and aggressive behavior? // Program & Abstract Book of the 24th Danube Congress of Psychiatry & 12th Central European Neuropsychopharmacological Symposium / Jakovljević, Miro (ur.). Zagreb: Medicinska naklada Zagreb, 2010. 60-61.

24. Nenadić-Šviglin, Korona; Nedić, Gordana; **Nikolac, Matea**; Mustapić, Maja; Mück-Šeler, Dorotea; Pivac, Nela. Sleep disturbances and platelet serotonin in alcoholism // Periodicum Biologorum Vol 112, Suppl 1 / Vitale, Branko (ur.). Zagreb: Hrvatsko prirodoslovno društvo, Institut Ruđer Bošković, Laserplus, 2010. 96-96.

25. Pivac, Nela; Kozarić-Kovačić, Dragica; Nenadić-Šviglin, Korona; **Nikolac, Matea**; Nedić, Gordana; Mustapić, Maja; Grubišić Ilić, Mirjana; Mück-Šeler, Dorotea. Insomnia and serotonergic mechanisms in psychiatric disorders // Program & Abstract book of 24th Danube Congress of Psychiatry & 12th Central European Neuropsychopharmacological Symposium / Jakovljević, Miro (ur.). Zagreb: Medicinska naklada Zagreb, 2010. 66-67.

26. Pivac, Nela; Nedić, Gordana; **Nikolac, Matea**, Borovečki, Fran; Šagud, Marina; Hajnšek, Sanja; Vuksan Čusa, Bjanka; Mihaljević Peleš, Alma; Mück-Šeler, Dorotea. The association between functional catechol-o-methyltransferase polymorphism and smoking in male and female schizophrenic patients and healthy subjects // Zbornik sažetaka 2. hrvatskog kongresa o nuspojavama psihofarmaka s međunarodnim sudjelovanjem / Uzun, Suzana (ur.). Zagreb: Agencija za lijekove i medicinske proizvode, 2010. 61-62.

27. Pivac, Nela; Nedić, Gordana; **Nikolac, Matea**; Mustapić, Maja; Babić, Ana; Kozarić Kovačić, Dragica; Grubišić Ilić, Mirjana; Kovačić, Zrnka; Mück-Šeler, Dorotea. Gene polymorphisms in veterans with combat related posttraumatic stress disorder // SINAPSA Neuroscience Conference '09 Book of abstracts / Koritnik, Blaž; Osredkar, Damjan; Vodušek, Vid V (ur.). Ljubljana, Slovenia: Lotos d.o.o. Talog 2, Postojna, 2009. 70-71.

Neobjavljena sudjelovanja na skupovima

1. Pivac, Nela; Borovečki, Fran; **Nikolac, Matea**; Mück-Šeler, Dorotea; Koršić, Mirko. Differential gene expression in visceral and subcutaneous tissue of obese women.

Diplomski radovi

1. **Matea Nikolac**. Učinak hiperoksigenacije na lipidnu peroksidaciju u mozgu, jetri i plućima miševa / diplomski rad. Zagreb: Prirodoslovno-matematički fakultet, 30. 09. 2008. 2008, 72 str. Voditelj: Balog, Tihomir.

Druge vrste radova

1. Pivac, Nela; Nedić, Gordana; **Nikolac, Matea**; Šagud, Marina; Mihaljević-Peleš, Alma; Mück-Šeler, Dorotea. Nove spoznaje o etiologiji psihotičnih poremećaja, str. 17-32, 2010.

Vođenje disertacija, magistarskih i diplomskih radova

1. Petra Nižić. Uloga polimorfizama gena za katehol-o-metil transferazu i dopaminski transporter u alkoholizmu / završni rad - diplomski/integralni studij. Zagreb, Hrvatska: Prirodoslovno-matematički fakultet, 16.09. 2013., 70 str. Voditelj: Pivac, Nela.