

# Vrijednost određivanja ukupnog i fosforiliranog tau proteina iz likvora u diferencijalnoj dijagnozi sindroma demencije

---

**Boban, Marina**

**Doctoral thesis / Disertacija**

**2009**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:355664>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-02-24**



*Repository / Repozitorij:*

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Marina Boban**

**Vrijednost određivanja ukupnog i fosforiliranog tau proteina iz likvora u diferencijalnoj dijagnozi sindroma demencije**

**DISERTACIJA**



**Zagreb, 2009.**

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Marina Boban**

**Vrijednost određivanja ukupnog i  
fosforiliranog tau proteina iz likvora u  
diferencijalnoj dijagnozi sindroma  
demencije**

**DISERTACIJA**

Zagreb, 2009.

Istraživanje je provedeno u Hrvatskom institutu za istraživanje mozga u Zagrebu te u Klinici za neurologiju Kliničkog bolničkog centra Zagreb i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Voditelj rada je prof. dr. sc. Goran Šimić.

Zahvaljujem se prof. dr. sc. Goranu Šimiću na stručnom vođenju i podršci tijekom izrade ovog rada.

Zahvaljujem se svojoj obitelji bez čije potpore i razumijevanja ovaj rad ne bi bilo moguće dovršiti.

Kolegama i prijateljima zahvaljujem na stručnoj podršci i pomoći.

## SADRŽAJ

<b>1. POPIS OZNAKA I KRATICA</b>	1
<b>2. UVOD</b>	3
<b>2.1 Alzheimerova bolest (AB)</b>	3
2.1.1 Opći dio	3
2.1.2 Klinička prezentacija Alzheimerove bolesti	5
2.1.3 Klinički kriteriji	7
<b>2.2 Markeri AB</b>	10
2.2.1 Karakteristike idealnog markera	10
2.2.2 Potencijalni markeri	11
2.2.3 Potencijalna korist od pronalaska biomarkera za Alzheimerovu bolest	15
<b>2.3 Markeri iz likvora u dijagnostici AB</b>	15
2.3.1 Osnova za korištenje markera iz likvora u dijagnostici AB i drugih vrsta demencija	15
2.3.2 Potencijalni markeri iz likvora u dijagnostici AB s osvrtom na patološki mehanizam AB	16
2.3.3 Tau patologija u drugim bolestima	22
<b>2.4 Frontotemporalna demencija (FTD)</b>	24
2.4.1 Prevalencija i klinička prezentacija	24
2.4.2 Klinički kriteriji	29
2.4.3 Patohistološka heterogenost	31
<b>2.5 Biomarkeri iz likvora u razlikovanju AB i FTD</b>	33
2.5.1 Kliničko preklapanje AB i FTD	33
2.5.2 Dosadašnje spoznaje	34

<b>3. CILJ ISTRAŽIVANJA</b>	36
<b>4. BOLESNICI/ISPITANICI I POSTUPCI</b>	38
4.1 Ispitanici	38
4.2 Metode	42
4.3 Statistička obrada	46
<b>5. REZULTATI</b>	48
5.1 Demografski podaci po skupinama	48
5.2 Vrijednosti markera t-tau, p-tau181 i p-tau199 po skupinama	59
5.3 Osjetljivost i specifičnost ispitivanih markera iz likvora	68
5.4 Korelacija kliničkih parametara i markera iz likvora po pojedinoj skupini	73
5.5 Kombinacije kliničkih parametara i markera iz likvora	75
<b>6. RASPRAVA</b>	80
<b>7. ZAKLJUČCI</b>	89
<b>8. SAŽETAK</b>	91
<b>9. SUMMARY</b>	92
<b>10. LITERATURA</b>	93
<b>11. ŽIVOTOPIS</b>	105

## 1. POPIS OZNAKA I KRATICA

AB	Alzheimerova bolest
A $\beta$	Beta-amiloid
aMCI	Amnestički oblik blagog kognitivnog oštećenja (engl. Amnestic type of Mild Cognitive Impairment)
APP	Prekursorni protein amiloida (engl. Amyloid Precursor Protein)
Apo E	Apolipoprotein E
AUC	Površina ispod krivulje (engl. Area Under the Curve)
CDR	Klinička skala za rangiranje demencije (engl. Clinical Dementia Rating scale)
CI	Interval pouzdanosti (engl. Confidence Interval)
CJD	Creutzfeldt-Jacobova bolest
CSF	Likvor (engl. Cerebrospinal Fluid)
DLBD	Difuzna demencija Lewyjevih tjelešaca (engl. Diffuse Lewy Body Dementia)
DLDH	Demencija bez jasnog histopatološkog nalaza (engl. Dementia Lacking Distinctive Histopathology)
DSM-IV-TR	Dijagnostički i statistički priručnik mentalnih bolesti i poremećaja (engl. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders)
EEG	Elektroencefalogram
ELISA	Enzimski povezana imunoapsorpcijska analiza (engl. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)
FDG-PET	Pozitronska emisijska tomografija koja koristi <sup>18</sup> F-fluorodeoksiglukoza kao obilježivač
FTD	Frontotemporalna demencija (engl. Frontotemporal Dementia)
FTDP-17	Frontotemporalna demencija s parkinsonizmom zbog mutacije <i>TAU</i> gena na kromosomu 17 (engl. Frontotemporal Dementia with Parkinsonism linked to Chromosome 17)
fvFTD	Frontalna varijanta FTD
MAPT	Protein tau povezan s mikrotubulima (engl. Microtubule-Associated Protein Tau)
MCI	Blago kognitivno oštećenje (engl. Mild Cognitive Impairment)

MKB-10	Međunarodna klasifikacija bolesti (ICD-10, engl. International Classification of Diseases)
MMSE	Skala minimalnog mentalnog statusa (engl. Mini Mental Status Examination)
MRI	Magnetska rezonancija (engl. Magnetic Resonance Imaging)
MTLA	Atrofija medijalnog temporalnog režnja (engl. Medial Temporal Lobe Atrophy)
NFS	Neurofibrilarni snopići (engl. Neurofibrillary Tangles)
NINCDS-ADRDA	Nacionalni institut za neurološke i komunikacijske poremećaje te moždani udar-Asocijacija za Alzheimerovu bolest i srodne poremećaje (engl. National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke-the Alzheimer's disease and Related Disorders Association)
OR	Omjer šansi (engl. Odds Ratio)
PET	Pozitronska emisijska tomografija (engl. Positron Emission Tomography)
PHF	Parni uzvojniti filamenti (engl. Paired Helical Filaments)
PIB-PET	Pozitronska emisijska tomografija koja koristi PIB (engl. Pittsburgh Compound-B) spoj kao obilježivač
PNFA	Progresivna nefluentna afazija (engl. Progressive Non-fluent Aphasia)
PSEN	Presenilin
P-tau	Fosforilirani tau protein
P-tau181	Tau protein fosforiliran na treoninu 181
P-tau199	Tau protein fosforiliran na serinu 199
P-tau231	Tau protein fosforiliran na treoninu 231
ROC krivulja	Od engl. Receiver Operating Characteristic; kratica označava grafički prikaz na kojem se na apscisi (x-osi) nalazi odnos lažno-pozitivnih rezultata (1-specifičnost), a na ordinati (y-osi) odnos stvarno-pozitivnih rezultata (osjetljivost) za različite mogućnosti graničnih (engl. cut-off) vrijednosti određenog dijagnostičkog testa
SD	Semantička demencija (engl. Semantic Dementia)
SP	Senilni plakovi (engl. Senile Plaques)
SPECT	Jednofotonska emisijska kompjutorizirana tomografija (engl. Single Photon Emission Computerized Tomography)
T-tau	Ukupni tau protein (engl. Total tau protein)
VaD	Vaskularna demencija (engl. Vascular Dementia)



## 2. UVOD

### 2.1 Alzheimerova bolest (AB)

#### 2.1.1 Opći dio

Dijagnoza demencije postavlja se ukoliko kod osobe postoji oštećenje bar dvije kognitivne domene uz oštećenje svakodnevnih životnih aktivnosti te očuvano stanje svijesti.<sup>1</sup> Prevalencija demencija je manja od 1% u dobnoj skupini od 60 do 64 godine, no od 65. godine života se udvostručuje svakih pet godina, te u dobi od 90 do 95 godina iznosi oko 40%.<sup>2</sup> Ti podaci se odnose samo na razvijeni svijet dok su u nerazvijenim zemljama nepotpuni. Na svijetu je 2001. godine 24 milijuna ljudi bolovalo od demencije. Zbog produženja životnog vijeka čovjeka, očekuje se udvostručenje tog broja svakih 20 godina, te se procjenjuje da bi do 2040. godine broj dementnih osoba mogao porasti do 81 milijuna.<sup>2</sup> Iz prethodnih podataka je vidljivo da demencija predstavlja sve veći medicinski i socioekonomski problem. Alzheimerova bolest (AB) je najčešći primarni uzrok sindroma demencije (60-70%).<sup>3-5</sup> Osim starenja, koji je očigledan rizični faktor za razvoj AB, epidemiološke studije navode i druge, manje jasne rizične čimbenike. Tako se navode smanjen „rezervni” kapacitet mozga, uključujući manji volumen mozga, nisko radno i edukacijsko dostignuće, smanjena mentalna sposobnost u ranijim fazama života, te smanjena mentalna i fizička aktivnost tijekom kasnijih razdoblja života.<sup>6-7</sup> „Rezervni” kapacitet mozga je određen brojem neurona te njihovih sinaptičkih i dendritičkih veza zajedno s kognitivnim funkcioniranjem vezanim uz životne navike. Smanjen „rezervni” kapacitet mozga povezan je s prosječno ranijom pojavom patoloških promjena tipičnih za AB.<sup>6</sup> Drugi potencijalni rizični

faktori s još uvijek nepoznatim mehanizmom djelovanja su trauma glave<sup>8</sup> i vaskularni rizični faktori (hiperkolesterolemija, hipertenzija, ateroskleroza, koronarna bolest, pušenje, pretilost i dijabetes).<sup>6</sup> Također su istraživani i povoljni utjecaji određenih prehrambenih navika (umjeren konzumacija alkohola te unos vitamina B12, homocisteina, vitamina C i E, nezasićenih masnih kiselina),<sup>9</sup> no rezultati za sada nisu dovoljno uvjerljivi da bi se izvukle jasne smjernice. Iako se čini da čimbenici okoline povećavaju rizik za sporadičnu AB, pokazano je da taj oblik ima i značajnu genetsku pozadinu. Velika populacijska studija na blizancima je pokazala da je nasljednost sporadičnog oblika AB visoka (do 79% u najboljoj varijanti modela), te da su i kod muškaraca i kod žena uključeni isti genetski faktori.<sup>10</sup> Osim sporadične AB, poznati su i obiteljski oblici AB u kojima značajnu ulogu imaju do sada otkrivene genske mutacije. Obiteljski oblici AB su izuzetno rijetki (ispod 0.1%)<sup>11</sup> i nasljeđuju se autosomno dominantno. Klinička prezentacija im najčešće započinje prije 65. godine života. Prva otkrivena mutacija za obiteljsku varijantu AB nalazi se na genu za prekursori protein amiloida (*APP*) koji se nalazi na 21. kromosomu, no ona objašnjava samo manji dio nasljednih varijanti AB.<sup>12</sup> Najveći dio obiteljskih oblika AB čine mutacije u visoko homolognim genima presenilin 1 (*PSEN1*) i presenilin 2 (*PSEN2*).<sup>13,14</sup> Povezanost između apolipoprotein E (apoE)-ε4 alela i AB pronađena je 1993. godine.<sup>15,16</sup> Meta-analizom je pokazano da jedan apoE-ε4 alel tri puta povećava relativni rizik razvoja AB, dok dva povećavaju relativni rizik oko 15 puta.<sup>17</sup> Djelovanje apoE-ε4 alela se najvećim dijelom bazira na modifikaciji vremena početka bolesti,<sup>18</sup> tako da svaka kopija alela snižava dob početka bolesti za otprilike 10 godina.<sup>15</sup> Pokazano je također da je apoE-ε4 alel najznačajniji genetski faktor u osoba sa sporadičnim oblikom AB.<sup>19</sup>

### 2.1.2 Klinička prezentacija Alzheimerove bolesti

AB je neurodegenerativna bolest karakterizirana podmuklim početkom te sporoprogresivnim oštećenjem epizodičkog pamćenja. Uz to su značajni i drugi kognitivni deficiti kao što su oštećenje govora (afazija), motornih vještina (apraksija) te percepcije (agnozija), kao i opće kognitivno propadanje koje uključuje otežano prosuđivanje, odlučivanje te orijentaciju. Naziv Alzheimerova bolest je u početku korišten samo za oboljele s početkom bolesti u presenilnom razdoblju (prije dobi od 65 godina; sada se zove i AB s ranim početkom, engl. early-onset Alzheimer's disease), dok se naziv senilna demencija koristio ukoliko je bolest nastupila nakon 65. godine života (sada i AB kasnog početka, engl. late-onset Alzheimer's disease). Nakon što je 1906. godine Alois Alzheimer opisao prvu pacijenticu s AB, 51-godišnju Augustu D. te pacijenta Johanna F., Kraepelin je dajući ime bolesti „dementia praecox“ zaključio da je AB presenilni oblik demencije, iako je već tada u svojoj knjizi iz psihijatrije u zagradi iza navedene rečenice izrazio sumnju da taj naziv možda i nije odgovarajući zbog postojanja slabo definiranog senilnog tipa demencije koji se javljao u starijoj populaciji. Temeljem histopatoloških istraživanja dokazano je da se iste patološke nakupine, senilni plakovi (SP) i neurofibrilarni snopići (NFS), nalaze u mozgovima bolesnika s AB kao i onih sa senilnom demencijom. Interesantno je, međutim, da su te patološke nakupine kao i kolinergički deficit izraženiji u AB ranog početka, nego u senilnoj demenciji.<sup>20,21</sup> Zapravo, razlikovanje starijih bolesnika s AB i nedementnih pojedinaca iste dobi temeljeno na neuropatološkim nalazima može predstavljati veliki problem.<sup>22,23</sup> Dok kod mlađih bolesnika s AB postoji jasna povezanost između težine demencije i stupnja rasprostranjenosti plakova i snopića, kod starijih bolesnika s AB nema jasne linearne povezanosti.<sup>24</sup> Ove novije spoznaje dovode u pitanje udruživanje ovih dvaju entiteta u

kliničkim istraživanjima u istu skupinu ispitanika. Danas se općenito smatra da senilna demencija i AB ranog početka imaju sličnu završnu neuropatološku sliku, ali vjerojatno različite mehanizme nastanka.<sup>25,26</sup>

Procijenjeno je da neurodegenerativne promjene u AB započinju 20-30 godina prije kliničkog početka bolesti.<sup>27</sup> Tijekom dugogodišnje pretkliničke faze bolesti dolazi do progresivnog nakupljanja patoloških nakupina karakterističnih za AB (SP i NFS), te se prelaskom određenog „praga“ pojavljuju prvi simptomi karakterizirani oštećenjem epizodičkog pamćenja. Taj se klinički stadij bolesti naziva još i faza blagog kognitivnog oštećenja (MCI, engl. Mild Cognitive Impairment) i karakterizirana je subjektivnim smetnjama pamćenja na koje se bolesnik žali, uz potvrdu bliskih mu osoba, te objektivnim neuropsihološkim testiranjem prilagođenim dobi i edukaciji.<sup>28</sup> MCI međutim nije jednoznačan entitet. Zbog etiološke heterogenosti, MCI može biti uvod u AB, kao i u druge vrste demencija, npr. vaskularnu (VaD), difuznu demenciju Lewyjevih tjelešaca (DLBD) te frontotemporalnu demenciju (FTD), no također može imati benignan tijek kao dio normalnog procesa starenja.<sup>29</sup> Histopatološkim istraživanjima je nađeno da bolesnici s tzv. amnestičkim oblikom MCI (aMCI, tako nazvanim zbog dominantnog objektivnog oštećenja pamćenja) imaju rane neuropatološke promjene karakteristične za AB, te se stoga aMCI smatra ranim stadijem AB<sup>30</sup> uz dokazani postotak konverzije u AB od oko 10-15% godišnje.<sup>28,31</sup> Početno oštećenje procesa pretvorbe kratkotrajnog u dugotrajno pamćenje nastaje kao posljedica patoloških promjena entorinalne moždane kore i hipokampalne formacije. Kasnije, zbog širenja neurofibrilarne degeneracije na ostale dijelove moždane kore dolazi do progresivnog oštećenja i drugih kognitivnih funkcija, npr. govora, vidno-prostornih i izvršnih funkcija. To

širenje patoloških promjena po regijama mozga koje objašnjava kliničko napredovanje AB u šest su stadija klasificirali Braak i sur.<sup>32</sup>

### 2.1.3 Klinički kriteriji

Klinička dijagnoza AB temelji se na DSM-IV-TR<sup>1</sup> (Dijagnostički i statistički priručnik mentalnih bolesti i poremećaja, engl. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders) i NINCDS-ADRDA<sup>33</sup> (Nacionalni institut za neurološke i komunikacijske poremećaje te moždani udar - Asocijacija za Alzheimerovu bolest i srodne poremećaje, engl. National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke and Alzheimer's Disease and Related Disorders Association) kriterijima. Prvonavedeni kriterij služi za postavljanje dijagnoze sindroma demencije, dok se upotrebom drugog kriterija postavlja klinička dijagnoza vjerojatne (engl. probable) ili moguće (engl. possible) AB. Dodatni kriteriji za AB sistematizirani su i u Međunarodnoj klasifikaciji bolesti (MKB-10),<sup>34</sup> no u istraživačke svrhe se češće koriste prethodno navedeni NINCDS-ADRDA kriteriji koji su publicirani prije više od 20 godina, te su još uvijek u kliničkoj praksi. Postavljanje dijagnoze vjerojatne AB se prema tim kriterijima temelji na isključivanju drugih uzroka demencija, dok se definitivna dijagnoza AB može postaviti jedino temeljem histopatološkog nalaza dobivenog obdukcijom. Kriteriji za postavljanje dijagnoze vjerojatne AB su sljedeći: dijagnoza demencije utvrđena kliničkim pregledom, dokumentirana pomoću MMSE (skale minimalnog mentalnog statusa, engl. Mini Mental Status Examination) skale<sup>35</sup> ili neke druge slične pretrage te potvrđena neuropsihološkim testiranjem; deficiti u najmanje dvije kognitivne domene; progresivno propadanje pamćenja i drugih kognitivnih domena; očuvano stanje svijesti; početak simptoma u razdoblju od 40. do 90. godine života, najčešće nakon 65. godine; izostanak sistemskih

bolesti ili bolesti mozga koje bi mogle utjecati na progresivno propadanje pamćenja i kognicije. Dodatni kriteriji su: progresivno propadanje specifičnih kognitivnih funkcija kao što su govor (afazija), motorne vještine (apraksija) i percepcija (agnozija); deterioracija svakodnevnih životnih aktivnosti te promijenjen obrazac ponašanja; pozitivna obiteljska anamneza, pogotovo ukoliko je potvrđena neuropatološki, te uredni nalazi lumbalne punkcije evaluirani standardnim tehnikama; uredan ili nespecifično promijenjen nalaz na EEG-u; nalaz atrofije mozga na kompjutoriziranoj tomografiji (CT) uz progresiju atrofije pri opetovanim snimanjima. Ukoliko su isključeni drugi mogući uzroci demencije, dijagnozu vjerojatne AB potpomažu i drugi nalazi: faze platoa (odnosno faze nenapredovanja kognitivnog deficita kroz nekoliko godina u određenog broja bolesnika); pridruženi simptomi depresije, nesanice, konfuzije, agresije, inkontinencije, deluzije, iluzije, halucinacije, katastrofični verbalni, emocionalni ili fizički ispadi, seksualne smetnje i gubitak težine; drugi neurološki ispadi u uznapredovalim stadijima bolesti uključujući motorne znakove kao što su povišen mišićni tonus, mioklonus i smetnje hoda; epileptični napadi u uznapredovalom stadiju bolesti; CT nalaz uredan za dob. Dijagnoza moguće AB je manje vjerojatna uz nagli početak; fokalne neurološke nalaze u ranim stadijima bolesti (npr. hemipareza, osjetni ispadi, deficiti vidnog polja, dismetrija); epileptičke napade ili smetnje hoda na početku ili vrlo rano tijekom bolesti.

Usporedbom s postmortalnim patohistološkim nalazom ustanovljeno je da upotreba NINCDS-ADRDA kriterija daje relativno dobru osjetljivost (prosjeck više publiciranih studija oko 80%), ali premalu specifičnost (prosjeck nekoliko neovisnih studija oko 70%) u postavljanju dijagnoze vjerojatne AB.<sup>36</sup> Ti rezultati su dobiveni kliničkim praćenjem bolesnika kroz nekoliko godina u viskospecijaliziranim centrima pa se pretpostavlja da su postotci i puno niži kod dijagnosticiranja bolesti u primarnoj medicinskoj praksi odnosno pri

dijagnosticiranju rane ili blage AB, te pri razlikovanju AB od drugih primarnih uzroka demencija. Jedan od problema kriterija je mogućnost postavljanja dijagnoze AB tek u kasnijim stadijima bolesti kad su kognitivni deficiti toliko izraženi da utječu na socijalne i radne sposobnosti oboljeloga. Osim toga, NINCDS-ADRDA kriteriji ne definiraju slučajeve AB uz dodatnu cerebrovaskularnu patologiju (ovaj komorbiditet se vidi u prosjeku u oko 50% slučajeva AB),<sup>37-39</sup> stoga nije jasno koliki je stupanj infarkta i lakunarnih promjena potreban za postavljanje dijagnoze, tzv. miješane demencije.

Trenutno su u različitim fazama pretkliničkih i kliničkih ispitivanja brojni spojevi koji bi mogli poslužiti kao lijekovi koji modificiraju patogenetski mehanizam AB (npr. inhibitori  $\beta$ -sekretaze, inhibitori ili modulatori  $\gamma$ -sekretaze i drugi). S obzirom na navedeno dugo presimptomatsko razdoblje bolesti, za očekivati je da bi navedeni spojevi imali najveću učinkovitost u ranoj, odnosno pretkliničkoj fazi bolesti u kojoj gubitak sinapsi i neurona nije opsežan.<sup>40,41</sup> Osim toga, ranije spomenuta spoznaja da aMCI često predstavlja rani oblik AB,<sup>30</sup> dovodi do potrebe za revizijom kriterija radi što ranijeg otkrivanja bolesti.<sup>42</sup> Zbog prethodno navedenih razloga postoji sve veća potreba pronalaženja bioloških markera koji bi omogućili ranu i točnu dijagnozu AB. Upravo je nedostatak pouzdanih biomarkera kojima bi se tijekom života i u ranim fazama bolesti mogli razlikovati različiti primarni uzroci sindroma demencije od ranih osamdesetih godina do danas predstavljao glavnu zapreku razvoju novih modaliteta liječenja.<sup>43</sup>

## 2.2 Markeri AB

### 2.2.1 Karakteristike idealnog markera

Pronalazak novih biomarkera za AB je od izuzetne važnosti kako za adekvatno diferenciranje prema drugim primarnim uzrocima demencije tako i za određivanje vjerojatnosti konverzije MCI u AB. Prema izvještaju radne grupe za markere (Konsenzusna grupa za molekularne i biokemijske markere Alzheimerove bolesti, engl. Consensus Group on Molecular and Biochemical Markers of Alzheimer's disease) najvažnije značajke idealnog markera Alzheimerove bolesti bi trebale biti zadovoljavajuća osjetljivost ( $\text{broj stvarno pozitivnih rezultata} / (\text{broj stvarno pozitivnih rezultata} + \text{broj lažno negativnih rezultata}) \times 100$ ) veća od 85% i specifičnost ( $\text{broj stvarno negativnih rezultata} / (\text{broj stvarno negativnih rezultata} + \text{broj lažno pozitivnih rezultata}) \times 100$ ) u rasponu od 75 do 85%, idealno >85%, potvrđene usporedbom s neuropatološki verificiranim slučajevima uz odražavanje specifične naravi patološkog procesa AB. Važne značajke markera su uz to i njegova pouzdanost i vjerodostojnost, prihvatljiva cijena, dostupnost, neinvazivnost i mogućnost ponavljanja mjerenja.<sup>44</sup>

Dijagnostički markeri Alzheimerove bolesti mogu se podijeliti na markere stanja (engl. state markers) i markere stadija (engl. stage markers).<sup>40</sup> Markeri stanja odražavaju intenzitet neuralnog oštećenja i degeneracije, te su im vrijednosti visoke kod opsežnijeg oštećenja mozga. Primjer takvog markera je koncentracija tau proteina u likvoru koja u akutnom cerebralnom infarktu korelira s veličinom infarciranog područja na CT mozga.<sup>45</sup> Povećanje koncentracije tau proteina u likvoru je također najveće u bolestima s najizrazitijom



neuronalmom degeneracijom kao što je Creutzfeldt-Jacobova bolest (CJD),<sup>46</sup> umjereno u bolesnika s AB u kojoj je degeneracija manje izražena, dok su uredne vrijednosti nađene u depresivnih bolesnika s malo ili bez neuronalne degeneracije.<sup>47,48</sup> Za razliku od markera stanja, markeri stadija odražavaju stadij uznapredovalosti degenerativnog procesa. Primjeri takvih markera su atrofija hipokampusa vidljiva neuroradiološkim tehnikama snimanja, tj. primjenom CT ili MRI (magnetska rezonancija, engl. magnetic resonance imaging) mozga te kliničke ocjenske skale koje mjere stupanj kognitivnog propadanja. S obzirom da patološki proces u AB započinje nekoliko desetljeća prije početka kliničke prezentacije, obje bi vrste markera trebale biti pozitivne već u ranoj fazi AB. Tako je potvrđeno da bolesnici s MCI imaju i povišene koncentracije ukupnog tau proteina u likvoru kao i atrofiju hipokampalne regije.<sup>49</sup> Međutim, utvrđeno je da je povećanje koncentracije tau proteina u likvoru MCI bolesnika izrazitije (povećanje za 210-290%)<sup>50-54</sup> nego stupanj atrofije hipokampusa (9-15% smanjenje volumena hipokampalne formacije).<sup>49</sup> Iz navedenog je evidentan golemi dijagnostički i prognostički potencijal markera stanja.

### 2.2.2 Potencijalni markeri

Neki od dosada istraživanih biomarkera pokazuju obećavajuću ulogu u dijagnosticiranju AB. Među njima su neuropsihološki markeri, neuroradiološki markeri (npr. procjena stupnja atrofije medijalnog temporalnog režnja korištenjem MRI), PET (pozitronska emisijska tomografija, engl. positron emission tomography) prikaz metabolizma glukoze i nakupina beta-amiloida ( $A\beta$ ) i NFS, nalaz hipometabolizma temporoparijetalnih režnjeva velikog mozga dobiven pomoću SPECT-a (jednofotonska emisijska kompjutorizirana tomografija, engl. single photon emission computerized tomography), te markeri iz likvora

odnosno iz krvi (npr. izoprostani, homocistein). Težnja je pronaći biomarker koji bi pospješio diferenciranje AB od drugih primarnih uzroka demencija, te prepoznao MCI bolesnika s visokim potencijalom konverzije u AB. Prema dosadašnjim istraživanjima od prethodno navedenih skupina markera MRI, PET i likvorski markeri su se pokazali najperspektivnijima. U pravilu su se od pojedinačnih markera informativnijim i pouzdanijim pokazale njihove kombinacije.

Inicijalne patomorfološke promjene u AB karakterizirane su atrofijom hipokampalne i entorinalne regije.<sup>55</sup> Iz te spoznaje proizlaze i neuroradiološke studije bazirane na procjeni volumena te praćenju smanjenja volumena medijalnog temporalnog režnja. Hipokampalna atrofija nađena kod bolesnika s AB kvantitativnim MRI snimanjem omogućava diferenciranje bolesnika s AB od kognitivno zdravih starijih osoba s točnosti od 80 do 90%.<sup>56,57</sup> Nažalost, malo je MRI studija koje su omogućile primjerenu diferencijaciju AB od drugih primarnih uzroka demencija, te su povrh toga potvrđene obdukcijom. Razlog je tomu nespecifičnost nalaza hipokampalne i entorinalne atrofije koji je prisutan i u drugim vrstama demencija, npr. FTD, VaD itd.<sup>58,59</sup> Zbog istoga razloga, Američka neurološka akademija (engl. American Academy of Neurology) još uvijek nije uvrstila mjerenje volumena medijalnog temporalnog režnja pomoću MRI u rutinsku obradu bolesnika s AB.<sup>36</sup> Iako se volumetrija medijalnog temporalnog režnja nije pokazala dobrom u diferenciranju primarnih vrsta demencija, pokazala je dobru predikciju konverzije MCI u AB. Valja ipak napomenuti da je preklapanje između dviju grupa izuzetno veliko da bi imalo prognostičku vrijednost za pojedinog bolesnika.<sup>60</sup> Stoga bi, s obzirom da su i starenje i AB neovisno povezani sa smanjenim volumenom hipokampusa, bilo potrebno postaviti kriterije hipokampalne atrofije za svaku dob.<sup>61</sup> Atrofija entorinalnog korteksa ponekad prethodi hipokampalnoj atrofiji u bolesnika s

AB, te je dobar prediktor konverzije MCI u AB.<sup>62,63</sup> Zanimljivi su najnoviji rezultati dobiveni na 118 mozgova osoba oboljelih od AB iz Brazilske studije za starenje mozga koji su pokazali da su najranije izražene promjene mozga kod bolesnika s AB u supratrohlearnoj podjezgi dorzalne rafe jezgre.<sup>64</sup> Očekuju se buduće MRI studije koje bi istražile vrijednost snimanja ovog područja u ranoj i diferencijalnoj dijagnostici AB.

PET učinjen korištenjem <sup>18</sup>F-fluorodeoksiglukoze (FDG) kao obilježivača je još jedna iznimno važna *in vivo* tehnika snimanja mozga kod bolesnika s AB. Karakterističan nalaz kod AB je hipometabolizam u temporalnom i parijetalnom korteksu te stražnjem cingulumu.<sup>57</sup> Ista je metoda pokazala visoku osjetljivost (84%) i specifičnost (93%) pri razlikovanju bolesnika s blagom AB od kognitivno zdravih ispitanika.<sup>65</sup> FDG-PET je također pokazao visoku specifičnost u diferencijaciji AB od drugih demencija, od kojih su neke studije dokazane i obdukcijom.<sup>66,67</sup> FDG-PET je, povrh toga, omogućio predikciju deterioracije u ispitanika s MCI kao i u zdravih starijih osoba.<sup>68,69</sup> Istovremenim PET i MRI snimanjem omogućeno je otkrivanje metabolizma glukoze samog hipokampusa čime se potpomaže diferenciranje kognitivno zdrave osobe u odnosu na MCI i AB. Pri tome se hipometabolizam hipokampusa prikazan FDG-PET-om pokazao boljim od MRI volumetrije.<sup>70</sup> U novije vrijeme razvijen je i *in vivo* prikaz amiloidnih plakova upotrebom PIB (engl. Pittsburgh Compound-B) PET-a koji je pokazao obećavajuće rezultate za predikciju deterioracije u MCI ispitanika kao i za diferenciranje AB i FTD.<sup>71-73</sup> Kod bolesnika s AB tipično dolazi do nakupljanja PIB obilježivača u kortikalnim regijama poznatim po sadržaju velikih količina A $\beta$  plakova. Upotrebom [18F]FDDNP (engl. 2-(1-{6-[(2-[F-18]fluoroethyl)(methyl) amino]-2-naphthyl}ethylidene)malononitrile) PET-a koji omogućava *in vivo* prikaz i amiloidnih plakova i neurofibrilarnih snopića, postignuta je na uzorku od 83 volontera visoka točnost

(bolji rezultati nego upotrebom FDG-PET i MRI) razlikovanja bolesnika s AB prema grupi ispitanika s MCI (98%) čime se FDDNP-PET nameće kao potencijalno važan biomarker rane dijagnoze AB.<sup>74</sup> Istražuju se i pronalaze sve sofisticiranije tehnike snimanja bazirane na PET i MRI.

Jedan od potencijalnih izvora markera je i likvor. O osnovi korištenja likvora u dijagnostici sindroma demencije te dosada istraženim markerima i njihovoj mogućoj kliničkoj uporabi, raspravljat će se detaljnije u idućim odlomcima.

Spoznaje o prethodno navedenim markerima (MRI, PET, likvor) dovele su do njihova uvrštenja u novopredložene istraživačke kriterije za AB u kojima služe kao pomoć osnovnim dijagnostičkim kriterijima.<sup>75</sup> Među pomoćnim dijagnostičkim kriterijima su: MTLA (gubitak volumena hipokampusa, entorinalnog korteksa ili amigdala dokazan pomoću MRI ili kvantitativno volumetrijom), abnormalne vrijednosti biomarkera iz likvora (niska koncentracija A $\beta$ 42, povišena koncentracija ukupnog tau proteina ili fosforiliranog tau proteina ili po mogućnosti kombinacija sva tri markera; kriteriji su također otvoreni i za bilo koji dodatni dobro validirani marker koji će biti otkriven u budućnosti), specifičan nalaz na PET-u (hipometabolizam glukoze u temporoparijetalnim regijama obostrano prikazan upotrebom FDG-PET-a; kriteriji su otvoreni i za moguće nove obilježivače kao što je PIB ili FDDNP ukoliko im bude potvrđena dijagnostička vrijednost), te dokazana autosomno dominantna mutacija među najbližim članovima obitelji.

### 2.2.3 Potencijalna korist od pronalaska biomarkera za Alzheimerovu bolest

Važnost pronalaska biomarkera iz likvora za Alzheimerovu bolest je višestruka. Prva potencijalna korist biomarkera je pomoć u dijagnostici čime bi se poboljšala točnost postavljanja dijagnoze, pogotovo prepoznavanja bolesti u vrlo ranom stadiju ili pretkliničkom obliku. Cilj je postići točnost biomarkera koja bi bila što bliža tzv. zlatnom standardu, tj. patohistološkom obdukcijском nalazu. Druga potencijalna korist pronalaska biomarkera za AB je spoznaja patogenetskog mehanizma bolesti. Takvi bi biomarkeri, izdvojeni pristupom proteomike, dali *in vivo* informacije o neurokemijskoj patogenezu kod bolesnika s AB. Treća potencijalna korist pronalaska biomarkera za AB je njihovo korištenje u studijama procjene djelotvornosti pojedinih lijekova čime bi se biomarkeri koristili u praćenju napredovanja/regresije bolesti te djelovanja lijekova. Četvrta potencijalna korist bi bila u novačenju MCI konvertora u studije s obzirom da još uvijek oko 50% MCI ispitanika u studijama nema pretklinički oblik AB već neprogresivni oblik MCI.

## 2.3 Markeri iz likvora u dijagnostici AB

### 2.3.1 Osnova za korištenje markera iz likvora u dijagnostici AB i drugih vrsta demencija

Budući da je izvanstanični prostor središnjeg živčanog sustava (SŽS) u izravnom dodiru s likvorom, te da krvno-moždana barijera ograničava protok proteina prema SŽS-u odnosno od njega, karakteristične patološke promjene u mozgu bolesnika se dobro reflektiraju u likvoru (stoga se katkad likvor naziva i „prozorom“ mozga). S obzirom da je patološki

proces u AB primarno lokaliziran na mozak, likvor je u posljednjih desetak godina postao važan predmet proučavanja s ciljem pronalaska biomarkera važnih za dijagnozu AB.

### 2.3.2 Potencijalni markeri iz likvora u dijagnostici AB s osvrtom na patološki mehanizam AB

Dva su pristupa otkrivanja potencijalnih biomarkera za AB u likvoru. Prvi pristup uključuje istraživanje biomarkera temeljeno na specifičnom patološkom/neurokemijskom supstratu bolesti (npr. ukupni tau protein kao marker neuronalne degeneracije ili A $\beta$  (A $\beta$ 40 ili A $\beta$ 42) kao marker beta-amiloidnog metabolizma i stvaranja plakova). Drugi pristup traganja i pronalaska novih markera uključuje korištenje proteomike upotrebom različitih tehnika: općim pristupom traganja za biomarkerom (tehnikama dvodimenzionalne gel elektroforeze, dvodimenzionalne tekuće kromatografije-masene spektrometrije, proteinskih čipova-masene spektrometrije), te specifičnim pristupom traganja za novim izooblicima ili postranslacijskim varijantama već otkrivenih proteina (tehnikama imunopročišćavanja-SELDI-TOF MS (engl. surface enhanced laser desorption/ionisation time of flight mass spectrometry) koristeći protutijelima omotane čipove ili imunoprecipitacije-MALDI-TOF MS (engl. matrix assisted laser desorption/ionisation time of flight mass spectrometry)).<sup>76-80</sup> Istraživanja markera iz likvora su djelomično limitirana činjenicom da lumbalna punkcija još uvijek ne predstavlja rutinsku dijagnostičku obradu bolesnika s demencijom.

Potencijalni markeri iz likvora za dijagnostiku AB trebali bi reflektirati najspecifičnije patološke promjene, a to su, prema dosadašnjim spoznajama, nalaz SP (nastaju agregacijom A $\beta$ ) i NFS (nastaju kao rezultat hiperfosforilacije tau proteina).<sup>81</sup> Ove patološke promjene

započinju 10-25 godina prije pojave kliničkih znakova demencije.<sup>82</sup> Tijekom tog razdoblja broj SP i NFS u mozgu raste, a dostizanjem „praga“ dolazi do pojave prvih simptoma bolesti. Osim SP i NFS, koji su prvenstveno locirani u strukturama medijalnog temporalnog režnja te kortikalnim regijama, karakterističan je i nalaz degeneracije neurona i sinapsi. Nekoliko je predloženih hipoteza o mogućoj patogenezi AB: agregacija i odlaganje A $\beta$ , hiperfosforilacija tau proteina, neurovaskularna disfunkcija, ali i druge kao što su upalni procesi, poremećaji staničnog ciklusa, poremećaji funkcije mitohondrija, oksidativni stres.<sup>83-86</sup> Prije 40 godina nađena je povezanost između kvantitativnih mjera demencije i senilnih promjena u sivoj tvari mozga kod starijih osoba.<sup>87</sup> Naknadno je sredinom 1980. otkriven glavni protein senilnih plakova (A $\beta$ ) te njegova struktura.<sup>88</sup> Isprva se A $\beta$  smatrao produktom patološkog procesa, no naknadno je nađeno da se proizvodi *in vivo* i *in vitro* tijekom normalnog staničnog metabolizma.<sup>89</sup> Nakon toga je kloniran i gen za *APP*,<sup>90</sup> te je predložen mogući mehanizam nastanka A $\beta$ . Prekursorni protein amiloida je veliki transmembranski protein unutar kojega se nalazi slijed aminokiselina iz kojeg će nakon cijepanja nastati A $\beta$  koji se jednim dijelom nalazi u transmembranskom prostoru, dok se preostalih 28 aminokiselina nalazi u izvanstaničnom prostoru. Dva su važna puta razgradnje APP: put  $\alpha$ -sekretaze i put  $\beta$ -sekretaze ovisno o enzimu koji razgrađuje APP protein. S obzirom da  $\alpha$ -sekretaza cijepa APP unutar slijeda A $\beta$ , na ovaj način ne dolazi do stvaranja A $\beta$  pa se taj put naziva i neamiloidogenim. Za razliku od njega, razgradnja  $\beta$ -sekretazom dovodi do cijepanja APP na početku A $\beta$ -slijeda i oslobađanja topljivog  $\beta$ sAPP ( $\beta$ -topljivog APP; engl.  $\beta$ -soluble amyloid precursor protein) iz kojeg će zatim u zavisnosti od pozicije djelovanja  $\gamma$ -sekretaze nastati A $\beta$  od 40 ili 42 aminokiseline (A $\beta$ 40 i A $\beta$ 42). Središnja hipoteza nastanka AB je hipoteza tzv. „amiloidne kaskade“ prema kojoj je inicijalni moment u razvoju AB neravnoteža između stvaranja i odstranjivanja A $\beta$  proteina u mozgu bolesnika, a koji u svojoj konačnici dovodi do

neurodegeneracije i demencije.<sup>91</sup> U prilog ovoj hipotezi govore nasljedni oblici AB što nastaju uslijed mutacija *APP* gena te *PSENI* i *PSEN2*. Disfunkcionalni protein presenilin-1 ključni je enzim za nastanak najvećeg broja obiteljskih oblika AB jer čini važan dio multiproteinskog kompleksa  $\gamma$ -sekretaze, zbog čega dolazi do povećane proizvodnje A $\beta$ 42.<sup>92</sup> Dodatni prilog ovoj hipotezi je i nalaz da se kod osoba s Downovim sindromom koje zbog prekomjernog 21. kromosoma imaju tri kopije *APP* gena plakovi razvijaju vrlo rano tijekom života (već od 7 godina starosti!), slično kao i u obiteljima kod kojih je nađena duplikacija *APP* lokusa.<sup>93</sup> Iz navedenih podataka zaključeno je da dugogodišnja pojačana ekspresija *APP* gena potiče odlaganje A $\beta$ . Jedan od ključnih, još uvijek nedovoljno upoznatih momenata ovog predmnijevanog mehanizma nastanka AB jest da topljivi A $\beta$  prolazi kroz konformacijske promjene i teži agregaciji u topljive oligomere i veća netopljiva vlakna. Pokazano je da tijekom ovog procesa A $\beta$ 42 potiče abnormalno „slaganje“ peptida A $\beta$  različite duljine jače nego A $\beta$ 40.<sup>94</sup> Iako se u početku smatralo da jedino A $\beta$  koji se nalazi u plakovima ima ovakav „neurotoksičan“ učinak, kasnije je ustanovljeno da i sami topljivi oligomeri A $\beta$  također mogu dovesti do pojedinih patoloških promjena, npr. inhibicije dugoročne potencijacije sinapsi intrinzičkog trisinaptičkog hipokampalnog puta i poremećaja sinaptičke plastičnosti.<sup>95</sup> U studiji na transgeničnim miševima (Tg2576) kojima je u genom unesena varijanta ljudskog *APP* gena povezanog uz AB nađeno je da izvanstanične nakupine topljivog 54-kDa velikog agregata A $\beta$  dovode do oštećenja pamćenja neovisno o količini plakova ili neuronalnog propadanja, te bi stoga mogle doprinijeti kognitivnom gubitku povezanom s AB.<sup>96</sup>

Drugi karakterističan patološki nalaz u mozgu bolesnika s AB su NFS koji su građeni od neprimjereno hiperfosforiliranog tau proteina.<sup>97,98</sup> Pokazano je da je brojnost NFS u mozgu bolesnika s AB u direktnoj korelaciji sa stupnjem demencije.<sup>99</sup> Tau protein nastaje uslijed



naizmjeničnog sparivanja eksona 2, 3 i 10 *MAPT* (protein tau povezan s mikrotubulima, engl. microtubule-associated protein tau) gena smještenog na dugom kraku kromosoma 17. Time u mozgu čovjeka nastaje šest izooblika tau proteina. Izooblici 1, 3 i 5 sadrže četiri (4R), a izooblici 2, 4 i 6 imaju po tri (3R) visoko-konzervirana ponavljajuća slijeda od 18 aminokiselina kojima poprečno povezuju mikrotubule, regulirajući njihova biološka svojstva (rigiditet, duljinu, stabilnost i kapacitet vezanja s drugim organelama).<sup>100</sup> Ovo djelovanje tau proteina većinom ovisi o njegovoj fosforilaciji, a u manjoj mjeri i glikozilaciji. Fosforilacija tau proteina je regulirana složenim odnosom mnogobrojnih kinaza (npr. GSK-3 $\beta$ , CDK 5) i fosfataza (npr. PP-1, PP-2).<sup>101</sup> Neprimjerena hiperfosforilacija (više od 8 do 12 mola fosfata po molu tau proteina) dovodi do promjene konformacije tau molekule i gubitka njene sposobnosti stvaranja poprečnih mostova koji povezuju mikrotubule čime dolazi do polimerizacije i nakupljanja tau proteina u obliku ravnih, a zatim i parnih uzvojitih filamenata (PHF, engl. paired helical filaments).<sup>102</sup> Neprimjerena hiperfosforilacija tau proteina u AB dovodi do odvajanja tau proteina od mikrotubula što uzrokuje raspad mikrotubula i posljedično oštećenje aksoplazmatske funkcije sinapsi i u konačnici smrt živčanih stanica.<sup>101</sup> Hiperfosforilirani tau protein se nakuplja u obliku netopljivih vlaknaca te u citoplazmi neurona tvori NFS. Vrijednosti tau proteina (no ne i njegove mRNA) su u mozgu bolesnika s AB 4 do 8 puta veće u usporedbi s mozgovima kontrolne skupine koja se bitno ne razlikuje po dobi i spolu, a taj je porast povezan isključivo s abnormalno hiperfosforiliranim tau proteinom.<sup>103</sup> Abnormalno hiperfosforilirani tau protein ne nalazi se samo u NFS (građenim većinom od parnih uzvojitih filamenata),<sup>97</sup> nego i u citosolu moždanog tkiva bolesnika s AB (u nefibriliranom obliku).<sup>104</sup> Tau protein u sastavu NFS-a je zapravo inertan i jedino se *in vitro* defosforilacijom može izdvojiti iz PHF kompleksa i vršiti svoju funkciju povezivanja mikrotubula.<sup>105,106</sup> Nasuprot tome, abnormalno hiperfosforiliran tau protein iz citosola koji

može činiti i do 40% ukupnog abnormalnog tau proteina u mozgu bolesnika s AB,<sup>107</sup> ne stupa u interakciju s alfa- i beta-tubulinom mikrotubula *in vitro*, već uzrokuje odvajanje normalnog tau proteina i drugih s mikrotubulima povezanih proteina (npr. MAP1A/MAP1B i MAP2) od mikrotubula.<sup>108-110</sup> Povezivanje abnormalno hiperfosforiliranog tau proteina iz citosola s normalnim tau proteinom u *in vitro* uvjetima rezultira stvaranjem snopića od približno 2.1 mm.<sup>109</sup> Tau protein je u mozgu bolesnika s AB abnormalno hiperfosforiliran na preko 30 mjesta, no ne pridonose sva mjesta pretvorbi normalnog tau proteina u „nepoželjnu“ molekulu. Fosforilacija na serinu 262, treoninu 231 i serinu 235 inhibira vezanje tau proteina za mikrotubule za 35, 25 i 10%.<sup>111</sup> Hiperfosforilacija tau proteina od 4 do 6 mola fosfata po molu tau proteina dovoljna je za indukciju navedenog štetnog učinka. Dodatna fosforilacija do razine od oko 10 mola fosfata po molu tau proteina dovodi do polimerizacije tau proteina u filamente. U usporedbi s normalnim produktima *TAU* gena, čini se da se tau proteini u osoba s FTDP-17 mutacijom (frontotemporalna demencija s parkinsonizmom zbog mutacije *TAU* gena na kromosomu 17, engl. frontotemporal dementia with parkinsonism linked to chromosome 17) brže fosforiliraju, što dovodi do njihove ranije polimerizacije u filamente. Do sada predložena mjesta fosforilacije tau proteina koja su vjerojatno odgovorna za konverziju tau proteina u „toksični“ oblik su serin 199/202/205, treonin 212, treonin 231/serin 235, serin 262/356 te serin 404. Daljnja fosforilacija na treoninu 231, serinu 396 i serinu 422 uzrokuje međusobno povezivanje tau proteina u vlakanca.<sup>112</sup> Kao što je već prije spomenuto, ovakve patološke promjene tau proteina započinju u mozgu bolesnika s AB i nekoliko desetljeća prije vidljivih kliničkih simptoma. NFS se najprije uočavaju u zvjezdolikim neuronima transentorinalnog područja, a zatim se ove promjene transneuronalno šire prema hipokampusu, amigdaloidnom skupu jezgara, temporalnom izokorteksu i ostalim dijelovima

neokorteksa.<sup>55</sup> Još uvijek nije poznat uzrok ovakvog transneuronalnog širenja neurofibrilarne degeneracije (virus, izostanak neurotrofnih činitelja ili drugi...?).

Iz prethodno navedenih spoznaja o histopatološkim značajkama AB, „nametnule“ su se molekule – potencijalni biološki markeri AB. Među njima su najznačajniji tau proteini (ukupni ili fosforilirani) kao i A $\beta$  proteini. U posljednjih nekoliko godina razvijeni su vrlo osjetljivi, sada i komercijalno dostupni biokemijski testovi kojima se u likvoru mogu detektirati koncentracije ukupnog tau proteina, tau proteina fosforiliranih na hidroksilnim skupinama nekih aminokiselina (npr. serina 199, treonina 181 i 231) kao i pojedinih oblika A $\beta$  proteina (A $\beta$ 40, A $\beta$ 42, A $\beta$ 38). Dijagnostička vrijednost navedenih molekula vrlo brzo se pokazala izuzetno korisnom u diferenciranju AB od promjena koje prate normalno starenje što je inače relativno čest problem u kliničkoj praksi.<sup>40</sup> Naime, koncentracija ukupnog tau proteina u likvoru je u prosjeku oko 300% veća u bolesnika s AB nego u kontrolnoj populaciji. Presjek nekoliko velikih prospektivnih studija ustanovio je srednju osjetljivost ukupnog tau proteina od 84% uz specifičnost od 91% u razlikovanju AB od normalnog starenja.<sup>114</sup> Nasuprot tome, koncentracija A $\beta$ 42 je prosječno oko 50% manja u skupini oboljelih od AB u odnosu na kontrolnu skupinu, što se objašnjava nakupljanjem A $\beta$  u obliku SP, zbog čega u osoba s AB manja količina A $\beta$  difundira u likvor. Rezultati nekoliko velikih prospektivnih studija pokazali su da je osjetljivost pri razlikovanju AB od normalnog starenja za A $\beta$ 42 89%, a specifičnost 90%.<sup>114</sup> Budući da u studijama pojedinačni markeri ipak nisu pokazali dovoljnu dijagnostičku snagu i pouzdanost, preporučeno je korištenje kombinacije markera.<sup>115</sup> Tako na primjer pri razlikovanju AB od normalnog starenja kombinacija ukupnog tau proteina i A $\beta$ 42 dostiže osjetljivost od 85 do 94% uz specifičnost od 83 do 100%, zbog čega je s fosforiliranim tau proteinom uvrštena u novopredložene istraživačke kriterije za AB

kao pomoćni dijagnostički test.<sup>75</sup> Dijagnostička točnost navedenih biomarkera potvrđena je i usporedbom s neuropatološkim nalazima.<sup>116</sup> Uredne vrijednosti ukupnog tau proteina i Aβ42 su nađene u nekoliko bolesti koje se svrstavaju u diferencijalnu dijagnozu AB (npr. Parkinsonovoj bolesti, depresiji<sup>117</sup>), no upotreba istih markera za razlikovanje AB od drugih vrsta demencija (npr. FTD, DLBD) nije zadovoljavajuća.<sup>40</sup> U nekoliko je studija, međutim, pokazano da fosforilirani tau protein dostiže specifičnost i preko 80% pri razlikovanju AB od drugih primarnih vrsta demencija.<sup>118</sup> Novija su istraživanja okrenuta i prema prediktivnoj ulozi biomarkera iz likvora, tj. dijagnosticiranju potencijalnih bolesnika s AB unutar MCI populacije (tj. u prekliničkom stadiju bolesti), a dosadašnji su rezultati ohrabrujući.<sup>119</sup> U studiji rađenoj na 137 MCI ispitanika uz dugotrajno praćenje (oko pet godina) nađena je visoka osjetljivost (95%) uz zadovoljavajuću specifičnost (83-87%) za različite kombinacije biomarkera iz likvora.<sup>120</sup> Dugotrajno praćenje je osobito važno zbog godišnjeg stupnja konverzije MCI u AB od oko 10-15% pa se praćenjem u razdoblju od pet godina kao u prethodno navedenoj studiji omogućava otkrivanje većine oboljelih u ranom stadiju bolesti.<sup>28,121</sup>

### 2.3.3 Tau patologija u drugim bolestima

Osim u AB, neprimjereno hiperfosforilirani tau protein nakuplja se i u brojnim drugim neurodegenerativnim bolestima, tzv. tauopatijama. Tauopatije uključuju klinički heterogenu skupinu bolesti među kojima se, pored AB, kao najvažnije izdvajaju odrasli slučajevi Downovog sindroma, parkinsonizam-demencija kompleks s Guama, demencija s argirofilnim zncima (Braakova bolest), FTD (danas znamo da se samo u jednom dijelu ove skupine primarnih uzroka sindroma demencije postmortalnom neuropatološkom analizom u čeonom i

sljepoočnom režnju mozga nađu Pickova tjelešca i „Pickovi“ neuroni; pa ipak, usprkos DSM-IV klasifikaciji, umjesto termina FTD katkad se još uvijek u kliničkom žargonu (pogrešno jer je bolesnik živ, a točna neuropatološka dijagnoza još nije poznata) za ovu zapravo cijelu skupinu bolesti koristi i „stariji“ naziv Pickova bolest), kortikobazalna degeneracija, palido-ponto-nigralna degeneracija, progresivna supranuklearna paraliza, Gerstmann-Sträussler-Scheinkerova bolest (nasljedni oblik prionske bolesti) i dementia pugilistica.<sup>101</sup> Jedno od glavnih patoloških obilježja svake od ovih tauopatija je nakupljanje abnormalno hiperfosforiliranog tau proteina tj. neurofibrilarna degeneracija. Pronalaskom mutacije u *TAU* genu i njenim povezivanjem s nastankom nasljedne frontotemporalne demencije s parkinsonizmom (FTDP-17) 1998. godine je po prvi put dokazano da mutacije *TAU* gena dovode do neurodegeneracije i demencije.<sup>122-124</sup> Pored same mutacije, molekularna klasifikacija tauopatija danas se također temelji i na razlikama u fosforilaciji i sadržaju pojedinih izooblika tau proteina. U ovisnosti od dominacije pojedinih izooblika na taj način je definirano pet glavnih klasa tauopatija. U klasi 0 nalazi se FTD (ne-AB, ne-Pick) uz gubitak ekspresije tau proteina. U klasi 1 nalazi se AB (i sporadični i obiteljski oblici), ali i neki nasljedni oblici FTDP-17 karakterizirani elektroforetskim tau tripletima od 60, 64 i 69 kDa. U klasi 3 nalaze se Pickova bolest i neki nasljedni oblici FTDP-17 karakterizirani za njih tipičnim parom elektroforetskih tau pruga od 60 i 64 kDa.<sup>125</sup> Na temelju svih do sada navedenih činjenica može se s pravom zaključiti da je inhibicija stvaranja abnormalno hiperfosforiliranog tau proteina jedan od najznačajnijih terapijskih imperativa za liječenje kako AB, tako i drugih tauopatija.

Od svih tauopatija je u diferencijalnoj dijagnozi AB najvažnija klinički i patohistološki heterogena frontotemporalna demencija (FTD).

## 2.4 Frontotemporalna demencija (FTD)

### 2.4.1. Prevalencija i klinička prezentacija

Kliničkim studijama je procijenjeno da prevalencija FTD unutar sindroma demencije iznosi 3.2%,<sup>126</sup> dok pregledom postmortalnih uzoraka mozga bolesnika sa sindromom demencije relativna prevalencija iznosi 3-10%.<sup>127</sup> FTD je čest uzrok demencije u bolesnika mlađih od 65 godina, a epidemiološki podaci pokazuju da je u toj dobnoj skupini FTD po učestalosti odmah uz AB.<sup>128,129</sup> Prevalencija FTD je oko 2,5 puta veća u dobi od 60 do 69 godina (9.4/100.000) u usporedbi sa starosnim grupama od 50 do 59 i od 70 do 79 godina.<sup>130</sup> U studiji provedenoj na ispitanicima starijim od 65 godina na području sjevernog Londona ustanovljena je prevalencija od 7.8,<sup>131</sup> pri čemu je prevalencija za dob iznad 85 godina iznosila 3. Iz toga je zaključeno da bi za točne procjene prevalencije trebalo uvijek uključivati i stariju populaciju.<sup>132</sup>

Donekle slično kao i AB, FTD započinje podmuklo. Prvi simptomi se obično javljaju u dobi od 45 do 65 godina uz srednje vrijeme trajanja bolesti od 7 do 9 godina.<sup>133,134</sup> Bolest podjednako zahvaća i muškarce i žene. U studiji napravljenoj u južnoj Nizozemskoj koja je obuhvaćala 245 bolesnika s FTD, medijan početka bolesti je bio 58 godina, pri čemu je najmlađi bolesnik imao 33, a najstariji 80 godina. Postotak žena bio je 51%. U 43% slučajeva FTD je nađena u jednog ili više članova obitelji u prvom koljenu. U 34 bolesnika ustanovljena je mutacija *TAU* gena (devetnaest P301L, pet L315R, četiri G272V, četiri R406W, jedan Delta K280 i jedan S320F). Sva 34 bolesnika su imala pozitivnu obiteljsku anamnezu.<sup>130</sup> Klinička slika FTD je karakterizirana promjenama osobnosti, ponašanja te izvršnih funkcija i

govora. Za razliku od AB, kognitivne domene kao što su pamćenje, percepcija, prostorna orijentacija i praksija su u početku bolesti relativno dobro „sačuvane“. FTD se dijeli na tri klinička sindroma: tzv. frontalnu varijantu FTD (fvFTD), progresivnu nefluentnu afaziju (PNFA) i semantičku demenciju (SD). Klinička slika FTD može biti udružena s motoričkom prezentacijom kortikobazalne degeneracije, progresivne supranuklearne paralize ili bolesti gornjeg motoneurona.<sup>135</sup>

FvFTD je karakterizirana promjenom osobnosti bolesnika koja se očituje neprimjerenim socijalnim ponašanjem i disinhibicijom koje ne predstavljaju samo naglašenije premorbidne osobine ličnosti,<sup>136</sup> ali i potpuno novim promjenama uključujući gubitak osjećaja prikladnosti i socijalnih normi, impulzivnost, djelomičan ili potpun gubitak uvida u situaciju (bolesnik nije svjestan tih promjena), gubitak intelektualne fleksibilnosti (npr. bolesnik mora obaviti određeni zadatak koji je u tom trenutku neprimjeren), kao i gubitak sposobnosti rješavanja novih situacija i problema.<sup>137</sup> Također je čest nalaz emocionalne otupjelosti, gubitka empatije i emocionalne topline prema članovima obitelji i prijateljima.<sup>134,138,139</sup> Usprkos svemu navedenom, a za razliku od bolesnika s AB, bolesnici s fvFTD se u ranom stadiju bolesti relativno dobro snalaze u izvršavanju svakodnevnih aktivnosti (jedan od kriterija za dijagnozu AB), te su im pamćenje, vidno-prostorne, perceptualne i govorne sposobnosti (za koje nisu „direktno odgovorni“ čeonni dijelovi mozga) sačuvane.<sup>134</sup> Ipak, ponekad smetnje pamćenja mogu biti izražene i u ranom stadiju bolesti.<sup>140</sup> U fvFTD se također mogu javiti i simptomi i znakovi depresije i tjeskobe, no manje su učestali nego u AB.<sup>138,141</sup> Skrbnici često navode i promjene ili uvođenje novih prehrambenih navika (pogotovo pretjerivanje u jedenju slatkiša, alkoholnim pićima ili pušenju cigareta, rijetko čak i konzumiranje prašine, zemlje i sl.).<sup>142</sup> Dodatna važna obilježja fvFTD su gubitak inicijative i

motivacije, stereotipno ponašanje kao i utilizacijsko ponašanje (nesvjesna potreba da se predmet koji se nalazi unutar vidnog polja i/ili unutar dohvata ruke uzme i koristi, npr. ukoliko se bolesniku unutar vidnog polja stave naočale on će ih uzeti i staviti na oči i bez verbalnog naloga iako već ima naočale na očima). U jednog dijela oboljelih vidi se inaktivnost, a u drugog nemir i neobjašnjiva energija, pri čemu se oba navedena obilježja mogu izmjenjivati u istog bolesnika.<sup>134,143,144</sup> U kasnijim fazama bolesti dolazi i do pojave ekstrapiramidnih simptoma. Šireći se prema sljepoočnim i tjemenim režnjevima, degenerativni proces zahvaća i druge kognitivne domene, no deficiti čeonog režnja ostaju dominantni sve do završnog stadija bolesti. Propadanjem dominantnog čeonog režnja u završnim stadijima bolesnici mogu postati nijemi i apatični.<sup>140</sup> Nalaz deluzija i halucinacija je izrazito rijedak.

PNFA i SD započinju smetnjama govora, no mogu imati pridružene i druge simptome oštećenja čeonog režnja. PNFA je karakterizirana progresivnim gubitkom tečnosti (fluentnosti) govora kojeg bolesnici postaju svjesni ranije od okoline. Govor postaje otežan, pun fonoloških grešaka, te se produkcija govora smanjuje (tzv. telegrafski govor).<sup>145</sup> Ponavljanje, pogotovo dužih riječi, praćeno je fonološkim greškama, no može biti i sačuvano. Već je 1987. godine Mesulam, opisujući šest bolesnika s PNFA, zamijetio da je bolest u početnoj fazi ograničena samo na smetnje govora, te da tek nakon „osam do dvanaest godina od početka bolesti“ dolazi do pojave drugih kognitivnih deficita i demencije,<sup>146-148</sup> kao i do progresije u mutizam u poodmaklom stadiju bolesti.<sup>140</sup> Stoga bolesnicima nije potrebna pomoć drugih osoba sve do kasnih stadija bolesti. Karakterističan MRI nalaz je atrofija u području oko lateralne brazde (lat. sulcus lateralis Sylvii) lijeve hemisfere, no nalazi mogu biti vrlo heterogeni: od urednog nalaza do atrofije lijeve hemisfere,<sup>149</sup> globalne atrofije<sup>150</sup> te



obostrane atrofije čeonog režnja.<sup>151</sup> Zanimljiv je nalaz nađen upotrebom kognitivnih uz događaj vezanih potencijala (ERP, engl. event-related potentials) pomoću kompjutorski izračunate srednje reference (AR, engl. average reference). Naime, kod bolesnika s PNFA, kojima je SPECT-om nađena funkcionalna abnormalnost u lijevoj hemisferi mozga, ERP-om je otkrivena negativna P-300 komponenta na krivuljama dobivenim nad lijevim frontalnim, centralnim i parijetalnim odvodima. Važno je napomenuti da je P-300 komponenta nad zdravim regijama mozga te nad desnom stranom mozga kod bolesnika s PNFA pozitivna čime se upotrebom ERP-a bolesnici s PNFA mogu otkriti relativno rano u tijeku bolesti.<sup>152</sup> Kolinergički sustav je najvažniji za generaciju i modulaciju amplitude i latencije P-300, a neuropatološka istraživanja upućuju da bi za razvoj PNFA važnu ulogu mogla imati subputaminalna jezgra (NSP; lat. nucleus subputaminalis), nakupina kolinergičnih neurona u prednjem dijelu bazalnog prednjeg mozga (engl. basal forebrain) usko povezana s bazalnim ganglijima (lat. nucleus basalis).<sup>153,154</sup> Nekoliko je spoznaja koje idu u prilog toj pretpostavci: NSP je evidentno veća na lijevoj strani (u najrostralnijim i anterointermedijalnim nivoima),<sup>153</sup> njena kolinergična vlakna putuju kroz vanjsku čahuru bijele tvari (lat. capsula eksterna)<sup>155</sup> prema donjem čeonom režnjiću,<sup>153</sup> NSP ima najnaprednija filogenetska i citokemijska svojstva<sup>153</sup> te najdugotrajniji razvoj od svih magnocelularnih nakupina unutar bazalnog prednjeg mozga.<sup>156</sup> Sve te spoznaje izrazito upućuju da je NSP specifična za ljude te povezana s kortikalnom regijom za govor pa bi shodno tome mogla igrati važnu ulogu u razvoju PNFA.<sup>153</sup>

Glavna karakteristika SD je progresivni gubitak semantičkog znanja.<sup>157</sup> Termin semantičko znanje odnosno semantičko pamćenje uključuje poznavanje značenja pojedinih riječi, dobro poznatih činjenica i objekata. SD se još naziva i progresivna tečna (fluentna)

afazija jer je govor bolesnika tečan (fluentan) pa se isprva problemi u svakodnevnom govoru ni ne primjećuju budući da bolesnik nadomješta nepoznate riječi s onima koje se inače češće koriste a mogu zvučati primjereno kontekstu (npr. umjesto riječi „vuk“ upotrijebit će riječ „pas“, a kasnije tijekom bolesti riječ „životinja“ ili umjesto riječi „nalivpero“ upotrijebit će riječ „olovka“, a kasnije uslijed napredovanja bolesti riječ „pisalica“). Zbog sačuvanosti prednjeg (motoričkog) područja za jezične sposobnosti, u početku bolesti obično nema gramatičkih grešaka, a jednako su tako normalni izgovor, dikcija, ponavljanje riječi i sintaksa. Deficit kod bolesnika sa SD može lako ostati neprepoznat ukoliko se tijekom pregleda zaustavimo samo na razgovoru s pacijentom bez detaljnijeg ispitivanja kognitivnih funkcija. Uobičajeno ispitivanje pomoću MMSE testa zbog njegove nedovoljne osjetljivosti za ovakvu vrstu kognitivnih promjena može dovesti do lažno negativnog rezultata, tj. neprepoznavanja stvarnog stanja bolesnika sve do kasnih stadija bolesti. Detaljnijim kognitivnim ispitivanjem naći će se nesposobnost definiranja pojma, imenovanja predmeta, neverbalnog semantičkog povezivanja (npr. upotrebom testa palminog drveta, engl. palm tree test), kao i testiranjem korištenja određenih alatki (npr. korištenje stetoscopa).<sup>158</sup> SD se u praksi često dijagnosticira kao AB pa se stoga katkad doima da je ova bolest vrlo rijetka. Bolesnici vrlo često gubitak semantičkog znanja referiraju kao „probleme s pamćenjem“, no ukoliko ih se detaljnije ispita neki ipak ispravno navode gubitak „pamćenja za značenje pojmova“, a ne gubitak pamćenja za događaje. Valja napomenuti da je oštećenje semantičkog znanja značajka i AB, no taj se deficit javlja kasnije u tijeku bolesti, uobičajeno tek nakon već razvijenog oštećenja epizodičkog pamćenja, pažnje ili vidno-prostornih sposobnosti. Za razliku od AB, bolesnici s SD imaju sačuvano pamćenje za svakodnevne događaje, a čak i u kasnoj fazi bolesti najčešće nemaju poremećen osjećaj snalaženja u prostoru. Uz sve prethodno navedene deficite mogu se

naći i različiti stupnjevi promjene osobnosti. Karakterističan nalaz dobiven pomoću MRI je asimetrična, ograničena atrofija sljepoočnog režnja koja je izraženija u lijevoj hemisferi.<sup>157</sup>

U izuzetno rijetku podskupinu FTD spadaju bolesnici s prozopagnozijom (poteškoće ili nemogućnost prepoznavanja ljudskih lica) koja je karakterizirana MRI nalazom koji ukazuje na zahvaćenost sljepoočnog režnja desne hemisfere.<sup>159</sup>

#### 2.4.2 Klinički kriteriji

Dijagnoza FTD se tijekom života temelji na kliničkim kriterijima (Neary i sur.<sup>160</sup>), dok se definitivna dijagnoza potvrđuje temeljem histopatološkog nalaza dobivenog obdukcijom.

Prema Nearyjevim kriterijima za postavljanje dijagnoze fvFTD bolesnik bi trebao imati sljedeće dijagnostičke značajke: podmukao početak uz postepenu progresiju simptoma, rano oštećenje socijalnog kontakta i kontrole vlastitog ponašanja, rano emocionalno otupljivanje uz gubitak uvida u situaciju. Potporne dijagnostičke značajke su: poremećaj osnovnih higijenskih navika i uređivanja, mentalna rigidnost i nefleksibilnost; rastresenost i motorički nemir; hiperoralnost i promjene u prehranbenim navikama; perseveracija; stereotipno ponašanje; utilizacijsko ponašanje (nesvjesna potreba da se predmet koji se nalazi unutar vidnog polja i/ili dohvata ruke uzme i koristi). Karakteristične promjene govora i jezika su: promijenjena produkcija govora (izostanak spontanosti i ekonomičnost govora, smanjena produkcija govora), stereotipan govor, eholalija, perseveracija, mutizam. Mogući fizikalni znakovi uključuju postojanje primitivnih refleksa, inkontinencije, znakova parkinsonizma, nizak i labilan krvni tlak. Dodatno je važan i nalaz značajnog oštećenja

izvođenja testova za čeonu režanj tijekom neuropsihološkog testiranja, uredan nalaz EEG-a (elektroencefalograma) kao i nalaz atrofije predominantno čeonog i/ili prednjeg dijela sljepoočnog režnja na slikovnim prikazima mozga.

Za postavljanje dijagnoze PNFA bitne su sljedeće dijagnostičke značajke: podmukli početak i postepena progresija simptoma bolesti uz netečan (nefluantan) spontani govor, te bar jedna od sljedećih značajki: agramatizam, fonemske parafazije, anomija. Potporne dijagnostičke značajke uključuju: promjene govora i jezika (mucanje ili oralna apraksija, oštećeno ponavljanje, aleksija, agrafija, značenje riječi sačuvano u ranoj fazi bolesti, mutizam u kasnoj fazi bolesti), te promjene ponašanja (sačuvane socijalne vještine u ranoj fazi bolesti, promjene ponašanja karakteristične za fvFTD tek u kasnijoj fazi bolesti). Dodatne značajke su eventualni kontralateralni primitivni refleksi u kasnijoj fazi bolesti te znakovi parkinsonizma).

Ključne dijagnostičke značajke SD uključuju: podmukli početak i postepenu progresiju simptoma, smetnje jezika (tečan i prazan govor; gubitak značenja riječi manifestiran oštećenjem sposobnosti imenovanja i razumijevanja govora; semantičke parafazije) i/ili perceptualne smetnje (prozopagnozija; asocijativna agnozija), sačuvano perceptualno povezivanje i preslikavanje, sačuvano ponavljanje jedne riječi i čitanja na glas, sačuvano pisanje pravopisno ispravnih riječi po diktatu. Pomoćne dijagnostičke značajke uključuju: smetnje jezika i govora (potiskivanje govora, neuobičajeno korištenje riječi, nedostatak fonemske parafazije, površna disleksija i disgrafija, očuvano računanje), te smetnje ponašanja (gubitak sućuti i empatije; sužene preokupacije; škrtost). Dodatno je važan i nalaz izrazitog oštećenja semantičkog znanja uz očuvanu sintaksu, pamćenje, perceptualno

procesiranje i uredne prostorne sposobnosti na neuropsihološkim testovima, uredan nalaz EEG-a i nalaz atrofije (simetrične ili asimetrične) prednjeg dijela sljepoočnog režnja.

Potporni kriteriji za sva tri sindroma FTD uključuju početak bolesti prije 65. godine života, pozitivnu obiteljsku anamnezu za slične smetnje u rođaka u prvom koljenu kao i nalaz bulbarne paralize, mišićne slabosti i propadanja (atrofije), fascikulacija mišića (jer u manjem broja bolesnika može biti prisutna bolest donjeg motornog neurona).

Knopman i sur.<sup>161</sup> izvijestili su o visokoj osjetljivosti (85%) i specifičnosti (99%) kliničkih kriterija za FTD u usporedbi s obdukcijским nalazom, no rezultate treba uzeti s oprezom jer je ova studija provedena u jednoj od ponajboljih visokospecijaliziranih ustanova iz područja demencija. Pretpostavka je da su u manje specijaliziranim centrima osjetljivost i specifičnost manje od navedenih.

#### 2.4.3 Patohistološka heterogenost

Kod bolesnika s FTD nalazi se gubitak neurona u površnim kortikalnim slojevima čeonog i sljepoočnog režnja. Dodatno bolesnici u živčanim stanicama moždane kore navedenih režnjeva mogu imati tau-pozitivne nakupine (inkluzije), ubikvitin-pozitivne nakupine ili se pak ne mora naći ni jedan oblik navedenih nakupina (ovakva vrsta neuropatološkog nalaza u literaturi na engleskom jeziku naziva se „DLDH“, engl. dementia lacking distinctive histopathology, u prijevodu demencija bez jasnog histopatološkog nalaza). Inkluzije ubikvitina kod FTD morfološki se ne razlikuju od onih u bolestima motornog neurona.<sup>162</sup> Učestalost nalaza FTD s ubikvitin pozitivnim inkluzijama (FTD-U) je dugo

vremena bio zanemariv, no otkad su se rutinski počela koristiti adekvatna bojenja, broj DLDH nalaza je značajno pao. Prema kliničko-patološkoj korelaciji, svi bolesnici s FTD povezanom s bolešću motornog neurona obično imaju tau negativne, ubikvitin pozitivne (tau-; u+) inkluzije.<sup>135,163-166</sup> Nedavno je otkriveno da je za jedan dio ovakvih slučajeva odgovorna mutacija gena za progranulin, što dovodi do nastanka unutarstaničnih ubikvitiniranih nakupina sačinjenih najvećim dijelom od TDP-43 proteina (engl. transactive response DNA binding-protein).<sup>167-169</sup> Pri tome nema prisutnosti amiloida bilo koje vrste, a budući da se slične nakupine TDP-43 vide i u sporadičnih i obiteljskih slučajeva amiotrofične lateralne skleroze (ALS), neki su autori predložili da FTD i ALS možda predstavljaju samo dijelove spektra iste skupine bolesti - TDP-43 proteinopatije.<sup>170</sup> Ukoliko je FTD povezana s ekstrapiramidnim značajkama kortikobazalne degeneracije ili progresivne supranuklearne paralize češće je karakterizirana tau pozitivnom (tau+) patologijom.<sup>135,163,164,171</sup> Kod ostalih kliničkih entiteta (fvFTD, PNFA, SD) moguć je bilo koji od prethodno spomenutih patoloških nalaza. SD je najčešće povezana s tau negativnim, ubikvitin pozitivnim (tau-; u+) inkluzijama u histopatološkom nalazu.<sup>163,165,171,172</sup> Histopatološki nalazi fvFTD i PNFA izuzetno su heterogeni i kontradiktorni.<sup>135,163-165,171</sup> Ako se isključe patološke promjene karakteristične za AB tada postoji statistički značajna proporcija PNFA uzrokovana tau-pozitivnim Pickovim tjelešcima.<sup>135,163-165,171</sup>

## 2.5 Biomarkeri iz likvora u razlikovanju AB i FTD

### 2.5.1 Kliničko preklapanje AB i FTD

Razlikovanje AB i FTD koje se temelji isključivo na prethodno navedenim kriterijima ograničeno je mogućim preklapanjima kliničkih slika. AB se, naročito u ranijoj životnoj dobi, može klinički očitovati simptomima oštećenja čeonog režnja (poremećajem govora i izvršnih funkcija) pa diferencijalna dijagnoza prema FTD može biti izuzetno teška.<sup>173,174</sup> S druge strane, zbog velike varijabilnosti kliničke slike, katkad smetnje pamćenja mogu biti prisutne već u početnoj fazi FTD, no važno je napomenuti da je otežano zapamćivanje gotovo uvijek slabije izraženo u odnosu na simptome deficita čeonog režnja.<sup>175,176</sup> Veliko „preklapanje“ ovih dviju bolesti korištenjem samo kliničkih kriterija pokazala je i studija kojom se ocjenjivala specifičnost NINCDS-ADRDA kriterija.<sup>176</sup> Naime, većina je bolesnika s FTD (20 od 26) ispunila i kriterije za AB. Zbog navedenih podudarnosti u simptomatologiji AB i FTD nametnula se potreba za pronalaženjem markera koji bi omogućili pouzdano diferenciranje ovih dvaju primarnih uzroka sindroma demencije. Određene kliničke značajke ispitivane u studiji Bozeata i sur.<sup>177</sup> omogućile su poboljšano razlikovanje FTD i AB. U ovoj studiji je nađeno da su stupanj pouzdanosti dijagnoze FTD značajno povećavali sljedeći simptomi: povećana sklonost slatkoj hrani, stereotipno ponašanje, disinhibicija i slabije socijalno funkcioniranje kod FTD bolesnika, dok apatija i simptomi poremećaja izvršnih funkcija nisu bili diskriminativni.<sup>177</sup> Kao što je već napomenuto, klinički najzastupljeniji brzi test za probir bolesnika s kognitivnim smetnjama MMSE nije se pokazao pouzdanim ni za otkrivanje niti monitoriranje bolesnika s FTD, jer prečesto daje „uredne“ vrijednosti čak i u fazama bolesti kad je bolesnicima već potrebna medicinska skrb.<sup>178</sup>

### 2.5.2 Dosadašnje spoznaje

Dosadašnji rezultati studija koje su istraživale vrijednosti ukupnog tau proteina te fosforiliranih tau proteina iz likvora u razlikovanju AB i FTD su varijabilni, vjerojatno kao posljedica širokog raspona koncentracija tau proteina nađenih u mozgu bolesnika s FTD pri obdukciji:<sup>179-181</sup> od onih u kojima su navedeni markeri omogućili dobru diferencijaciju između dviju vrsta demencija (gdje su vrijednosti ukupnog tau proteina povišene kod AB, a kod FTD ili jednake vrijednostima nađenim kod zdravih kontrola<sup>182-184</sup> ili povišene u usporedbi sa zdravim kontrolama, no niže nego u bolesnika s AB<sup>47,185-190</sup>), sve do manjeg broja onih u kojima nije nađena statistička značajnost proučavanih biljega u diferenciranju tih dviju skupina.<sup>191</sup> Određivanjem vrijednosti koncentracija fosforiliranog tau proteina (fosforiliranih na epitopima koji se smatraju važnima za promjene konformacije molekule) u likvoru pospješuje se razlikovanje AB i FTD, pogotovo ukoliko se ovi podaci kombiniraju s izmjerenom koncentracijom ukupnog tau i/ili A $\beta$  proteina.<sup>192,193</sup> U studiji koja je uključivala FTD skupinu „proširenu“ bolesnicima s kortikobazalnom degeneracijom vrijednosti ukupnog tau proteina su bile značajno reducirane u skupini bolesnika s FTD nego AB, dok isti ili bolji rezultat, neočekivano nije pokazan za tau protein fosforiliran na treoninu 181.<sup>183</sup> Mogući uzrok ovim varijabilnostima rezultata je izuzetna heterogenost histopatoloških nalaza kod bolesnika s FTD, ali i velika razlika prosječne starosti bolesnika u dvjema navedenim grupama.<sup>194</sup> Malobrojne dosadašnje studije proučavale su biomarkere iz likvora u dobno podudarnim skupinama bolesnika s AB i FTD.<sup>191,192,195</sup> Štoviše, pažljivim pretraživanjem literature razvidno je da do sada nema objavljenih rezultata istraživanja koji opisuju



koncentracije tau proteina fosforiliranog na serinu 199 kod dobnog podudarnih skupina bolesnika s AB i FTD.

### 3. CILJ ISTRAŽIVANJA

Opći (glavni) cilj ove disertacije je bio ocijeniti korisnost triju biomarkera iz likvora: ukupnog tau proteina (t-tau), tau proteina fosforiliranog na treoninu 181 (p-tau181) te tau proteina fosforiliranog na serinu 199 (p-tau199) u diferencijalnoj dijagnozi bolesnika s AB i FTD. Hipoteza je prema tome bila da ne postoje razlike u koncentracijama navedenih proteina u likvoru između skupina bolesnika s AB i FTD koji se bitno ne razlikuju po dobi i spolu.

Specifični ciljevi su bili:

1. Odrediti postoje li statistički značajne razlike vrijednosti biomarkera t-tau, p-tau181 i p-tau199 iz likvora među ispitivanim skupinama, tj. između bolesnika s AB i FTD, te između bolesnika s AB odnosno FTD i zdravih ispitanika;
2. Odrediti osjetljivost i specifičnost svakog pojedinog markera (t-tau, p-tau181 te p-tau199) u diferencijaciji bolesnika s AB i FTD podudarnih dobnih skupina;
3. Odrediti osjetljivost i specifičnost kombinacija markera (t-tau, p-tau181 te p-tau199) u diferencijaciji bolesnika s AB i FTD podudarnih dobnih skupina;
4. Korelirati kliničke parametre i biomarkere iz likvora (t-tau, p-tau181 te p-tau199) unutar svake od navedenih skupina;
5. Usporediti kliničke parametre i vrijednosti biomarkera iz likvora (t-tau, p-tau181 te p-tau199) između muških i ženskih ispitanika za svaku pojedinu skupinu bolesnika/ispitanika;

6. Ocijeniti je li kombinacija biomarkera iz likvora pouzdanija za detekciju bolesnika s FTD u usporedbi s pojedinačnim markerima i
7. Odrediti kojim se modelom (kombinacijom kliničkih parametara i biomarkera iz likvora) postiže najbolji stupanj diferenciranja dijagnoze AB od FTD.

## 4. BOLESNICI / ISPITANICI I POSTUPCI

### 4.1 Ispitanici

U studiju su uključene tri skupine bolesnika/ispitanika koji su obrađeni u sljedećim ustanovama: Klinički bolnički centar Zagreb, Kišpatićeva 12, Zagreb, Hrvatska; Psihijatrijska bolnica Vrapče, Bolnička ulica 32, 10090 Susedgrad – Zagreb, Hrvatska, te Neurologische Klinik und Poliklinik; Klinikum der Universität München – Großhadern; Marchioninstr. 15; München, Germany.

1. U **prvu** skupinu su uključeni bolesnici s postavljenom dijagnozom vjerojatne (engl. probable) AB dijagnosticiranih prema NINCDS-ADRDA kriterijima<sup>33</sup> koji uključuju sljedeće:

- Dijagnoza demencije utvrđena kliničkim pregledom, dokumentirana pomoću MMSE skale ili neke druge slične pretrage i potvrđena neuropsihološkim testiranjem;
- Deficiti u dvije ili više kognitivnih domena;
- Progresivno pogoršanje pamćenja i drugih kognitivnih domena;
- Bez poremećaja stanja svijesti;
- Početak simptoma u razdoblju od 40. do 90. godine života, najčešće nakon 65. godine;
- Nedostatak sistemskih bolesti ili bolesti mozga koje bi mogle utjecati na progresivni deficit pamćenja i kognicije;

- Dodatni kriteriji bili su: progresivno propadanje specifičnih kognitivnih funkcija kao što su govor (afazija), motorne vještine (apraksija) i percepcija (agnozija); smanjeni opseg svakodnevnih životnih aktivnosti i promijenjen obrazac ponašanja; pozitivna obiteljska anamneza za slične bolesti, pogotovo ukoliko je potvrđena neuropatološki, te uredni nalazi lumbalne punkcije evaluirani standardnim tehnikama; uredan nalaz na EEG-u ili nalaz nespecifičnih promjena na EEG-u; nalaz atrofije mozga na CT-u uz progresiju pri opetovanim mjerenjima;
- Suportivni kriteriji za dijagnozu moguće AB (ukoliko su isključeni drugi mogući uzroci demencije) bili su: faze platoa (odnosno faze nenapredovanja kognitivnog deficita kroz nekoliko godina kod pojedinih bolesnika); pridruženi simptomi depresije, nesanice, inkontinencije, deluzija, iluzija, halucinacija, katastrofičnih verbalnih, emocionalnih ili fizičkih ispada, seksualne smetnje i gubitak težine; drugi neurološki ispadi u uznapredovalim stadijima bolesti uključujući motoričke znakove kao što su povišen mišićni tonus, mioklonus i smetnje hoda; epileptični napadi u uznapredovalom stadiju bolesti; nalaz CT mozga uredan za dob.

2. U **drugu** skupinu su uključeni bolesnici s postavljenom dijagnozom FTD prema trenutno priznatim internacionalnim kliničkim kriterijima<sup>160</sup> koji uključuju:

- Kriterije za svaki od tri klinička sindroma FTD (FTD, PNFA i SD) koji su prethodno navedeni u poglavlju 2.4.2;

- Dodatni kriteriji: početak bolesti prije 65. godine života; pozitivna obiteljska anamneza za slične poremećaje u najbližoj obitelji; bulbarna paraliza, mišićna slabost i propadanje mišića (atrofija), fascikulacije mišića (pridružena bolest motornog neurona u manjeg broja bolesnika).

▪

Kriteriji neuključivanja ispitanika u **prvu** skupinu bili su:

- Nagli početak simptoma; fokalni neurološki deficiti u ranim stadijima bolesti (npr. hemipareza, osjetni ispadi, deficiti vidnog polja, dismetrija); epileptički napadi ili smetnje hoda na početku ili vrlo rano tijekom bolesti.

Kriteriji neuključivanja ispitanika u **drugu** skupinu bili su:

- Nagli početak s jasnim žarištem, početak povezan s traumom glave, rana i izrazita amnezija, prostorna dezorijentiranost, ponavljanje zadnjih slogova ili pojedinih fonema bez uloženog napora (koji postoji na primjer kod mucanja); gubitak tijeka misli; mioklonus; kortikospinalna slabost; cerebelarna ataksija; koreoatetoza; predominantni postcentralni strukturni ili funkcijski deficiti ili multifokalne lezije na CT-u ili MRI-u.

Kriteriji neuključivanja ispitanika u **prvu** ili **drugu** skupinu bili su:

- Nespecificirana demencija;

- Sumnja na miješanu demenciju (npr. VaD - veliki cerebralni infarkti ili „tihe” lakunarne lezije);
- Primarna psihijatrijska bolest (npr. psihoza ili depresija);
- Anamneza kroničnog alkoholizma;
- Druge neurološke bolesti koje mogu dovesti do kognitivnog propadanja (npr. multipla skleroza, normotenzivni hidrocefalus, tumori ili infektivne bolesti središnjeg živčanog sustava);
- Sekundarni uzroci kognitivnih smetnji (npr. hipo- ili hipertireoza);
- Sistemske bolesti (npr. malignomi, bolesti jetre);
- Uzimanje specifične terapije za demencije (npr. inhibitori acetilkolinesteraze).

3. **Treću** grupu sačinjavaju kognitivno zdravi ispitanici (kontrolna skupina ispitanika).

Kriteriji uključenja u kontrolnu skupinu su:

- Ispitanici s neprogresivnim (praćenim kroz period od jedne godine) subjektivnim smetnjama pamćenja;
- Kognitivno zdravi ispitanici kojima je u toku dijagnostičkog ili terapijskog procesa bilo indicirano učiniti lumbalnu punkciju;
- MMSE zbroj veći ili jednak 27;
- Nedostatak objektivno verificiranih smetnji pamćenja ili bilo kojih drugih kognitivnih smetnji;
- Odsutnost neurološke ili psihijatrijske bolesti koje mogu utjecati na kognitivno funkcioniranje;

- Odsutnost sistemske (npr. reumatoidnog artritisa) ili maligne bolesti;
- Neuzimanje lijekova za kognitivne probleme (npr. inhibitori acetilkolinesteraze) ili psihotropnih lijekova (iako nije nađen utjecaj uzimanja psihotropnih lijekova na koncentraciju t-tau u likvoru).<sup>196</sup>

## 4. 2 Metode

Svakom bolesniku/ispitaniku učinjen je kompletan fizikalni i neurološki pregled te neuropsihološko testiranje. Nadalje, učinjene su i sljedeće pretrage: rutinske krvne pretrage, određivanje koncentracija vitamina B12, folne kiseline, hormona štitnjače, sedimentacija eritrocita, serologija na sifilis, EKG, rendgenska snimka pluća, pregled očne pozadine, EEG, CT i/ili MRI mozga. Sve dijagnoze su postavljene nakon uvida u kompletnu medicinsku dokumentaciju od strane članova multidisciplinarnog tima (neurolog, neuropsiholog, neuroradiolog, psihijatar) koji nisu bili upoznati s rezultatima obrade likvora. Trajanje bolesti određivano je od datuma početka prvih simptoma bolesti (anamnestički ili heteroanamnestički podatak o smetnjama pamćenja ili promjenama osobnosti i ponašanja) sve do vremena lumbalne punkcije. Težina demencije rangirana je upotrebom MMSE.

Svim ispitanicima je pri početnoj evaluaciji učinjena dijagnostička lumbalna punkcija prema standardnom protokolu (uzimanje uzorka iz L3/L4 ili L4/L5 intervertebralnog prostora između 9-11 sati ujutro nakon prethodnog 30-minutnog hodanja i najmanje 12-satnog posta, količina uzorka oko 4-5 ml likvora). Od ukupne količine likvora, manji dio je centrifugiran na 10000g kroz 10 minuta na 4°C (kako bi se otklonile stanice i drugi netopljivi materijal) i pohranjen u količinama od 50 i 100 µl u polipropilenske epruvete na -80°C do trenutka

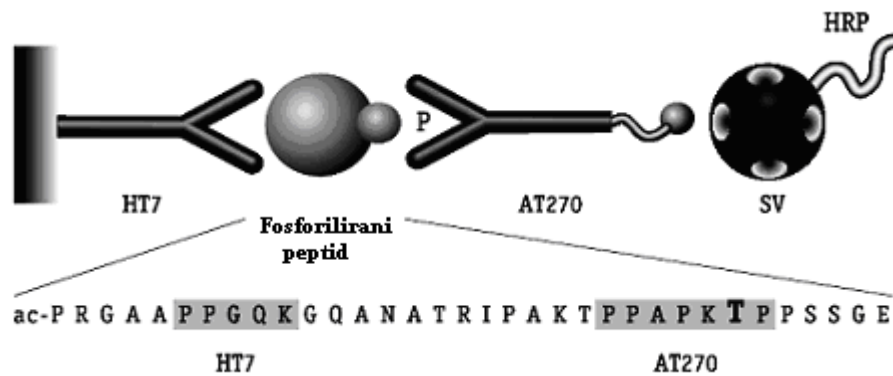


analize (prema preporuci proizvođača pojedinih kitova za određivanje koncentracije t-tau, p-tau181 i p-tau199). Preostali, veći dio uzorka je odmah rutinski obrađen (broj eritrocita i leukocita, koncentracija glukoze, laktata i ukupnih proteina, IgG indeks, postojanje oligoklonalnih traka, TPHA). Uzorci s više od 500 eritrocita/ $\mu$ L isključeni su iz ovdje opisanih rezultata analize i statističke obrade.

Za određivanje koncentracija biomarkera u likvoru korišteni su komercijalno dostupni ELISA (enzimski povezana imunoapsorpcijska analiza, engl. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) kitovi uz provođenje testova prema uputama proizvođača. Za određivanje t-tau i p-tau199 korišteni su ELISA kitovi human (Hu) Tau (Total) i Human (Hu) Tau [pS199] proizvođača Biosource International, Camarillo, CA, USA. Za određivanje p-tau181 korišten je ELISA kit Innotech Phospho-Tau<sub>(181p)</sub> proizvođača Innogenetics, Ghent, Belgija. Za provođenje ELISA analize korišten je ELISA čitač (model 680 Series; Biorad Laboratories, Hercules, USA) te automatski aparat za ispiranje (model PW 40; Biorad Laboratories, Hercules, USA). Određivanje t-tau, p-tau181 i p-tau199 u likvoru korištenjem ELISA tehnike provedeno je u Hrvatskom institutu za istraživanje mozga, Šalata 12, Zagreb, Hrvatska. Istraživanje je sastavni dio projekta MZOŠ RH pod nazivom „Fosforilacija tau proteina u razvitku i Alzheimerovoj bolesti”, br. 108-1081870-1942 čiji je voditelj prof. dr. sc. Goran Šimić.

Kitovi za ELISA postupak koji su korišteni u ovoj studiji omogućavaju kvantitativno određivanje koncentracija pojedinih markera (t-tau, p-tau181 te p-tau199) u likvoru bolesnika/ispitanika. Za ilustraciju postupka ovdje navodim izvođenje Innotech Phospho-Tau<sub>(181p)</sub> testa (slika 1.). Procedura se provodi na mikropločicama (engl. microplate) na

kojima se nalazi 96 jažica. Na stjenci jažica je vezano prvo monoklonalno protutijelo (HT7) koje po dodavanju uzorka u jažicu hvata fosforilirani tau protein ili njegove fragmente. Na kompleks protutijela HT7 i fosforiliranog tau peptida hvata se sljedeće protutijelo (biotinizirano anti-PHOSPHO-TAU<sub>(181p)</sub> protutijelo) koje specifično prepoznaje tau protein fosforiliran na treoninu 181. Nakon inkubacije od 14 do 18 sati na 2-8°C ispiri se višak biotiniziranog anti-PHOSPHO-TAU<sub>(181p)</sub> protutijela. Ispiranje se provodi na automatskom aparatu za ispiranje; model PW 40; Biorad Laboratories, Hercules, USA. Parametri ispiranja strogo su zadani i uključuju: pet ciklusa ispiranja, zadan volumen punjenja jažica od 400 µl po jažici, razinu do koje dodana tekućina smije ispuniti jažicu, trajanje jednog ciklusa aspiracije / pranja / namakanja. Nepoštivanje parametara može značajno utjecati na rezultate testa. Nakon ispiranja dodaje se sljedeća otopina koja sadržava streptavidin-peroksidaza (SV) konjugat. Nakon inkubacije od 60 min ± 5 min na sobnoj temperaturi provodi se ispiranje, te se nakon toga dodaje supstratna radna otopina (HRP, koja sadržava hidrogen-peroksid). Po inkubaciji od 30 min ± 3 min na sobnoj temperaturi u mraku dodaje se otopina za zaustavljanje procesa, te se absorbancija uzoraka očitava na ELISA čitaču (u ovom istraživanju je korišten model 680 Series; Biorad Laboratories, Hercules, USA, a korišten je filter za očitavanje na 450 nm prema uputama proizvođača), te se naknadno prema koncentracijama standarda određuje koncentracija p-tau181 u pojedinim jažicama. Najniža koncentracija koju test može detektirati je 15.6 pg/ml, dok je uobičajen raspon koncentracija od 25 do 150 pg/ml.



Slika 1. Shematski prikaz izvođenja Innotech Phospho-Tau<sub>(181p)</sub> testa<sup>197</sup>

Test se provodi u jažicama na čijoj je stjenici vezano monoklonalno protutijelo (HT7) koje po dodavanju uzorka hvata fosforilirani tau protein ili njegove fragmente. Na kompleks protutijela HT7 i fosforiliranog tau peptida hvata se AT270 (biotinizirano anti-PHOSPHO-TAU<sub>(181p)</sub> protutijelo) koje specifično prepoznaje tau protein fosforiliran na treoninu 181. Nakon inkubacije i ispiranja po strogo zadanim uvjetima dodaje se streptavidin-peroksidaza (SV) konjugat. Po inkubaciji i ispiranju, dodaje se supstratna radna otopina (HRP) koja sadržava hidrogen-peroksid, te se naposljetku absorbancija uzoraka očitava na ELISA čitaču.

### 4.3 Statistička obrada

Klinički parametri (MMSE, dob bolesnika i trajanje bolesti) kao i koncentracije triju markera iz likvora (t-tau, p-tau181 i p-tau199) su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija uz raspon, te pomoću medijana, 25. i 75. percentile i interkvartilnog raspona. Kolmogorov-Smirnov test (uz Lilliefors korekciju) korišten je za utvrđivanje normalnosti raspodjele pojedinih parametara (demografskih, kliničkih, laboratorijskih). Razlike među grupama po spolu procijenjene su pomoću hi-kvadrat testa. Za usporedbu vrijednosti demografskih, kliničkih i laboratorijskih parametara korišten je neparametrijski Kruskal-Wallis test kao test za ukupno razlikovanje među grupama, nakon kojeg je u slučaju značajne povezanosti između pojedinih skupina učinjen Mann-Whitney U-test za usporedbu parova. Za usporedbe je također korišten i t-test, a dobiveni rezultati uspoređeni s rezultatima Mann-Whitney U-testa. Analiza ROC (engl. receiver operating characteristic) krivulje (grafički prikaz na kojem se na apscisi (x-osi) nalazi odnos lažno-pozitivnih rezultata (1-specificnost), a na ordinati (y-osi) odnos stvarno-pozitivnih rezultata (osjetljivost) za različite mogućnosti graničnih (engl. cut-off) vrijednosti određenog dijagnostičkog testa) korištena je za procjenu dijagnostičke vrijednosti parametara iz likvora u razlikovanju ispitivanih skupina. Granične vrijednosti pojedinog proteina iz likvora definirane su kao vrijednosti na ROC krivulji u kojoj je umnožak osjetljivosti i specifičnosti dosegla maksimum. Dodatno će biti određena i specifičnost markera u razlikovanju među grupama uz osjetljivost iznad 85%. Osjetljivost i specifičnost su prikazane uz interval pouzdanosti (CI, engl. confidence interval) od 95%. Dodatno je prikazana i površina ispod ROC krivulje (AUC, engl. area under curve) kao indikator točnosti rezultata. Korelacija između pojedinih kliničkih parametara te vrijednosti markera iz likvora je testirana upotrebom Spearmanovog testa (r). Uz pomoć doc.

dr. sc. Miljenka Huzaka sa Zavoda za matematiku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu, korištena je logistička regresijska analiza za procjenu istovremenog učinka kliničkih parametara i vrijednosti triju promatranih markera pri razlikovanju AB i FTD skupina bolesnika. P-vrijednosti manje od 0.05 smatrale su se statistički značajnima.

## **5. REZULTATI**

### **5.1 Demografski podaci po skupinama**

U istraživanje su uključene tri skupine bolesnika/ispitanika: 27 bolesnika koji boluju od Alzheimerove bolesti, 25 bolesnika koji boluju od frontotemporalne demencije te 25 kontrolnih ispitanika (K). Demografski podaci o bolesnicima/ispitanicima uključenim u istraživanje prikazani su u tablicama 1.-5. te na slikama 2.-6.

Između AB i FTD skupine bolesnika nije bilo statistički značajne razlike u dobi, dok su i bolesnici s AB i FTD bili stariji u odnosu na ispitanike kontrolne skupine. Podaci o dobi bolesnika/ispitanika u trima navedenim skupinama prikazani su u tablici 1. te grafički na slici 2. Iako je parametar dobi slijedio normalnu raspodjelu u sve tri skupine ispitanika, s obzirom da se radilo o manjem broju ispitanika, za testiranje razlika parametra dobi među skupinama korišteni su i parametrijski (t-test) i neparametrijski (Mann-Whitney U test) testovi, kojima su dobiveni podudarni rezultati. U tablici 2. te na slici 3. prikazani su podaci o dobi početka prvih simptoma kod bolesnika s AB i FTD. U ove dvije skupine bolesnika nije bilo statistički značajne razlike u dobi nastupa kliničkih simptoma bolesti.

Tablica 1. Podaci o dobi bolesnika/ispitanika u trima skupinama (skupini bolesnika s AB i FTD te kontrolnoj skupini ispitanika) u trenutku izvođenja lumbalne punkcije

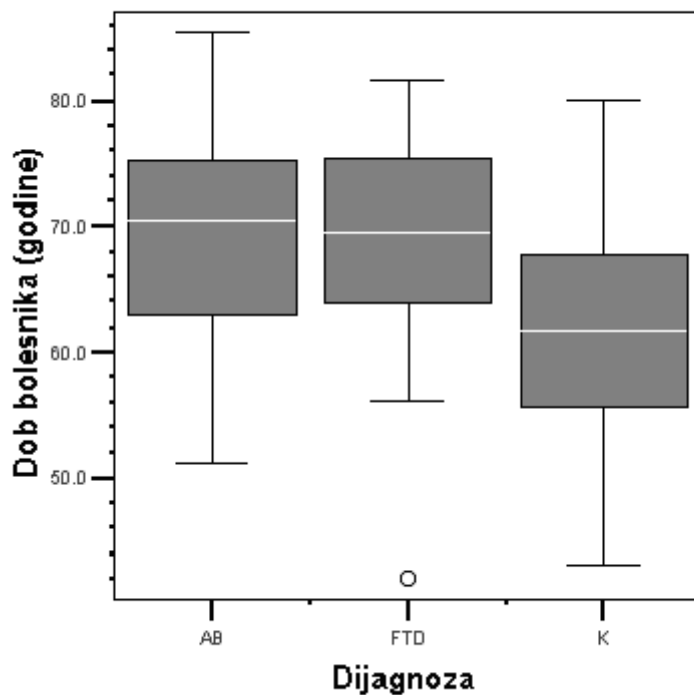
	AB (n = 27)	FTD (n = 25)	K (n = 25)	Ukupno (n = 77)	AB vs. FTD	AB vs. K	FTD vs. K
Srednja vrijednost ± standardna devijacija (raspon), godine	68,61 ± 8,77 (34,1)	68,62 ± 8,93 (39,4)	61,52 ± 9,67 (36,9)	66,37 ± 9,59 (43,2)	T-test t = -0,005 st. sl. = 50 p = 0,996	T-test t = 2,744 st. sl. = 49 p = 0,008*	T-test t = 2,670 st. sl. = 47 p = 0,01*
Medijan 25.-75. percentila (interkvartilni raspon), godine	70,40 62,6 - 75,4 (12,8)	69,50 63,15 - 75,70 (12,55)	61,65 54,95 - 67,93 (12,98)	66,60 59,80 - 74,88 (15,08)	U = 323,000 Z = -0,266 p = 0,791 M-W	U = 185,000 Z = -2,623 p = 0,009* M-W	U = 165,500 Z = -2,690 p = 0,007* M-W
Kolmogorov-Smirnov test	K-S d = 0,095 p = 0,749	K-S d = 0,090 p = 0,819	K-S d = 0,080 p = 0,966	K-S d = 0,059 p = 0,611			

AB = Alzheimerova bolest; FTD = frontotemporalna demencija; K = kontrolna skupina; M-W = Mann-Whitney U test; p\* statistički značajna razlika

Tablica 2. Podaci o dobi bolesnika (s AB i FTD) pri pojavi prvih simptoma bolesti

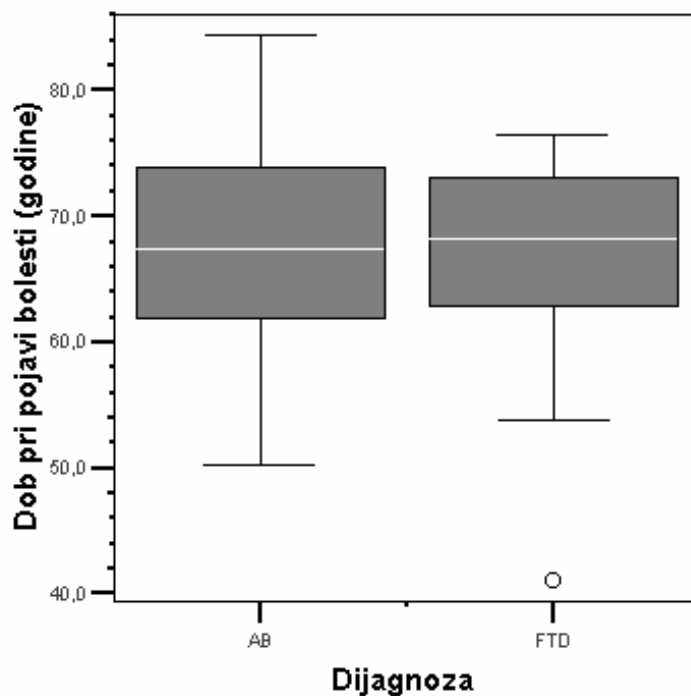
	AB (n = 27)	FTD (n = 25)	AB vs. FTD
Srednja vrijednost ± standardna devijacija (raspon), godine	66,85 ± 8,53 (34,1)	66,44 ± 8,10 (35,3)	T-test t = 0,178 st. sl. = 50 p = 0,859
Medijan 25.-75. percentila (interkvartilni raspon), godine	67,40 61,60-73,90 (12,3)	68,20 62,15 - 73,55 (11,4)	U = 332,500 Z = -0,092 p = 0,927 M-W
Kolmogorov-Smirnov test	K-S d = 0,085 p = 0,984	K-S d = 0,109 p = 0,739	

AB = Alzheimerova bolest; FTD = frontotemporalna demencija; M-W = Mann-Whitney U test; p\* statistički značajna razlika



Slika 2. Grafički prikaz dobne raspodjele bolesnika/ispitanika pri izvođenju lumbalne punkcije. Rezultati su prikazani kao okvir dijagrami gdje bridovi okvira predstavljaju 25. i 75. percentilu, a njihova razlika interkvartilni raspon. Vodoravna crta unutar okvira predstavlja 50. percentilu (medijan). Na slici je kružićem prikazana vrijednost koja odstupa od ostalih podataka u skupini za 1,5 - 3 dužine okvira mjereći od kraja okvira te se naziva blago nepodoban član grupe (engl. mild outlier ili outlier). Između skupina bolesnika s AB i FTD nije bilo statistički značajne razlike u dobi pri izvođenju lumbalne punkcije, dok su i bolesnici s AB i s FTD bili stariji u odnosu na ispitanike kontrolne skupine. AB = Alzheimerova bolest; FTD = frontotemporalna demencija; K = kontrolna skupina





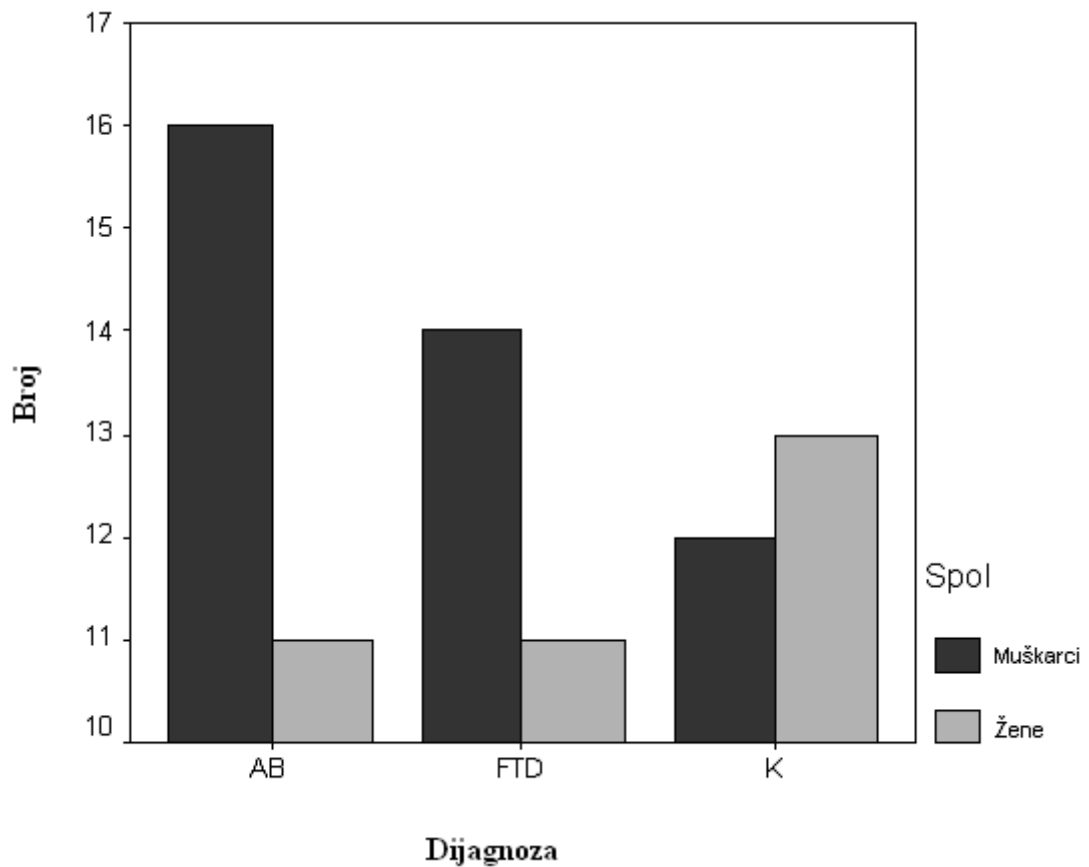
Slika 3. Grafički prikaz dobi bolesnika pri pojavi prvih simptoma bolesti. Rezultati su prikazani kao okvir dijagrami gdje bridovi okvira predstavljaju 25. i 75. percentilu, a njihova razlika interkvartilni raspon. Vodoravna crta unutar okvira predstavlja 50. percentilu (medijan). Na slici je kružićem prikazana vrijednost koja odstupa od ostalih podataka u skupini za 1,5 - 3 dužine okvira mjereći od kraja okvira te se naziva blago nepodoban član grupe (engl. mild outlier ili outlier). Između dvije skupine bolesnika nije bilo statistički značajne razlike u dobi nastupa kliničkih simptoma bolesti. AB = Alzheimerova bolest; FTD = frontotemporalna demencija

Podaci o raspodjeli spola u trima skupinama bolesnika/ispitanika prikazani su u tablici 3. te grafički na slici 4. Upotrebom  $\chi^2$ -testa nije nađena statistički značajna razlika u raspodjeli spola među trima skupinama ( $\chi^2 = 0,695$ , st. sl. = 2,  $p > 0.05$ ).

Tablica 3. Raspodjela spola u tri skupine bolesnika/ispitanika (u skupini bolesnika s AB i FTD te kontrolnoj skupini ispitanika)

	AB (n = 27)	FTD (n = 25)	K (n = 25)	Ukupno (n = 77)		AB vs. FTD	AB vs. K	FTD vs. K
M:Ž, %	16:11 59,26%:37,04%	14:11 56,0%:44,0%	12:13 48%:52%	42:35 54,55%:45,45%	$\chi^2 = 0,695$ st. sl. = 2 p = 0,706	$\chi^2 = 1,231$ st. sl. = 1 p = 0,267	$\chi^2 = 0,308$ st. sl. = 1 p = 0,579	$\chi^2 = 0,080$ st. sl. = 1 p = 0,777

AB = Alzheimerova bolest; FTD = frontotemporalna demencija; K = kontrolna skupina;  $\chi^2$  = hi kvadrat test



Slika 4. Grafički prikaz spolne raspodjele po skupinama. Na ordinati je označen ukupni broj muškaraca (crnom bojom) odnosno žena (sivom bojom) u skupini bolesnika s AB i FTD te kontrolnoj skupini ispitanika. Nije nađena statistički značajna razlika u raspodjeli spolova među trima skupinama. AB = Alzheimerova bolest; FTD = frontotemporalna demencija; K = kontrolna skupina

Nije bilo statistički značajne razlike u broju bodova dobivenom pomoću MMSE između skupina bolesnika s AB i FTD. S obzirom na kriterij uključenja ispitanika u kontrolnu studiju (MMSE veći ili jednak 27), statistički značajna razlika u broju MMSE bodova između dviju skupina bolesnika (AB i FTD) i zdravih kontrola bila je i očekivana. Upotrebom Kolmogorov-Smirnov testa, nađeno je da vrijednosti MMSE nisu slijedile normalnu raspodjelu u ukupnoj populaciji koja je uključivala sve tri skupine bolesnika/ispitanika, no

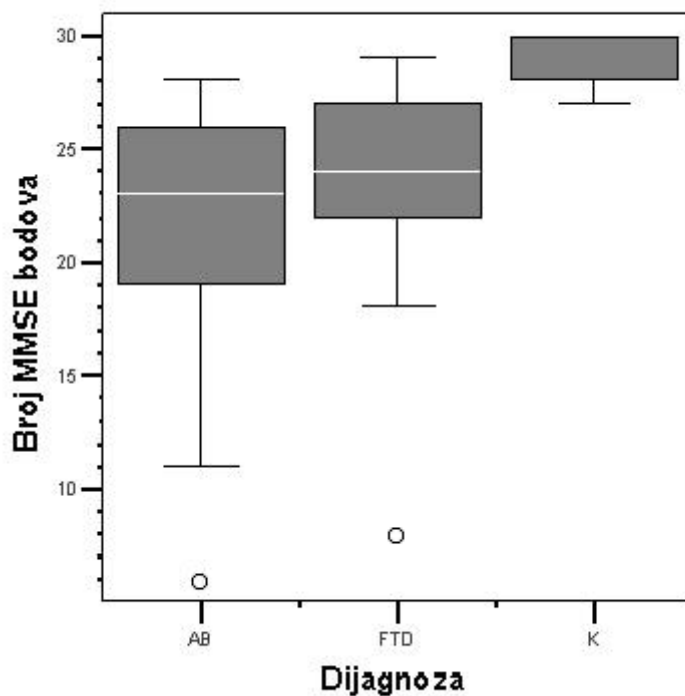
bez obzira na to učinjen je i parametrijski (t-test neovisnih uzoraka) i neparametrijski (Mann-Whitney U-test) test koji su dali podudarne rezultate. Podaci su prikazani u tablici 4. te grafički na slici 5.

Tablica 4. Raspodjela broja MMSE bodova u sve tri ispitivane skupine (skupini bolesnika s AB i FTD te kontrolnoj skupini ispitanika)

	AB (n = 27)	FTD (n = 25)	K (n = 25)	Ukupno (n = 77)
Srednja vrijednost ± standardna devijacija (raspon)	21,48 ± 5,95 (22)	23,44 ± 4,28 (21)	29,16 ± 1,03 (3)	24,69 ± 5,34 (24)
Medijan 25.-75. percentila (interkvartilni raspon)	23,0 18,5 – 26,0 (7,50)	24,00 21,50 -27,00 (5,50)	30,0 28,0 – 30,0 (2,0)	26 22 – 29 (7)
Kolmogorov- Smirnov test	K-S d = 0,136 p = 0,416	K-S d = 0,103 p = 0,399	K-S d = 0,207 p = 0,015	K-S d = 0,160 p = 0,026

AB vs. FTD	AB vs. K	FTD vs. K
T-test t = -1,339 st. sl. = 48 p = 0,187	T-test t = -6,372 st. sl. = 48 p < 0,001*	T-test t = -6,494 st. sl. = 48 p < 0,001*
U = 257,000 Z = -1,082 p = 0,279 M-W	U = 14,500 Z = -5,854 p < 0,001* M-W	U = 22,500 Z = -5,699 p < 0,001* M-W

AB = Alzheimerova bolest; FTD = frontotemporalna demencija; K = kontrolna skupina; M-W = Mann-Whitney U test; p\* statistički značajna razlika



Slika 5. Grafički prikaz raspodjele broja MMSE bodova po skupinama. Rezultati su prikazani kao okvir dijagrami gdje bridovi okvira predstavljaju 25. i 75. percentilu, a njihova razlika interkvartilni raspon. Vodoravna crta unutar okvira predstavlja 50. percentilu (medijan). Na slici je kružićem prikazana vrijednost koja odstupa od ostalih podataka u skupini za 1,5 - 3 dužine okvira mjereći od kraja okvira te se naziva blago nepodoban član grupe (engl. mild outlier ili outlier). Između skupina bolesnika s AB i FTD nije bilo statistički značajne razlike u broju bodova dobivenom pomoću MMSE. Nasuprot tome, s obzirom na kriterij uključenja ispitanika u kontrolnu studiju (MMSE veći ili jednak 27), nađena je statistički značajna razlika u broju MMSE bodova između dviju skupina bolesnika (AB i FTD) i zdravih kontrola koja je bila i očekivana. AB = Alzheimerova bolest; FTD = frontotemporalna demencija; K = kontrolna skupina

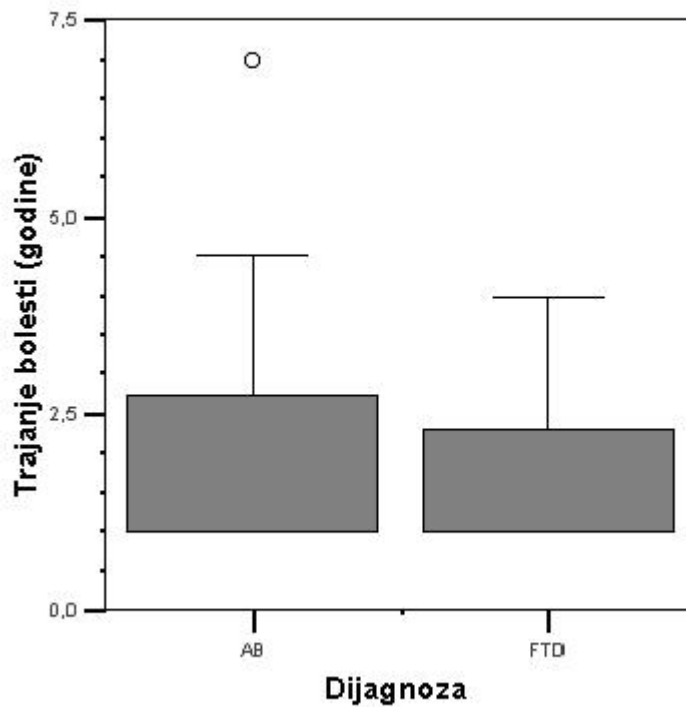
Podaci o trajanju bolesti u skupinama bolesnika s AB i FTD prikazani su u tablici 5. te grafički na slici 6. Iako varijabla trajanja bolesti nije imala normalnu raspodjelu u obje skupine bolesnika (pokazano upotrebom Kolmogorov-Smirnov testa), učinjen je i

parametrijski (t-test neovisnih uzoraka) i neparametrijski (Mann-Whitney U-test) test. Oba su testa dala podudarne rezultate, tj. nije bilo statistički značajne razlike u trajanju bolesti između skupina bolesnika s AB i FTD.

Tablica 5. Trajanje bolesti u skupini bolesnika s AB i FTD

	AB (n = 27)	FTD (n = 25)	AB vs. FTD
Srednja vrijednost ± standardna devijacija (raspon)	2,84 ± 3,613 (12,0)	2,43 ± 3,33 (10,0)	T-test t = 0,099 st. sl. = 51 p = 0,921
Medijan 25.-75. percentila (interkvartilni raspon)	1,0 1,0 – 12 (11,0)	1,0 1,0-11,0 (10,0)	U = 133,000 Z = -0,138 p = 0,929 M-W
Kolmogorov-Smirnov test	K-S d = 0,445 p = 0,004*	K-S d = 0,404 p = 0,008*	

AB = Alzheimerova bolest; FTD = frontotemporalna demencija; M-W = Mann-Whitney U test; p\* statistički značajna razlika



Slika 6. Grafički prikaz trajanja bolesti u skupini bolesnika s AB i FTD. Rezultati su prikazani kao okvir dijagrami gdje bridovi okvira predstavljaju 25. i 75. percentilu, a njihova razlika interkvartilni raspon. Na slici je kružićem prikazana vrijednost koja odstupa od ostalih podataka u skupini za 1,5 - 3 dužine okvira mjereći od kraja okvira te se naziva blago nepodoban član grupe (engl. mild outlier ili outlier). Nije nađena statistički značajna razlika u trajanju bolesti između skupina bolesnika s AB i FTD. AB = Alzheimerova bolest; FTD = frontotemporalna demencija



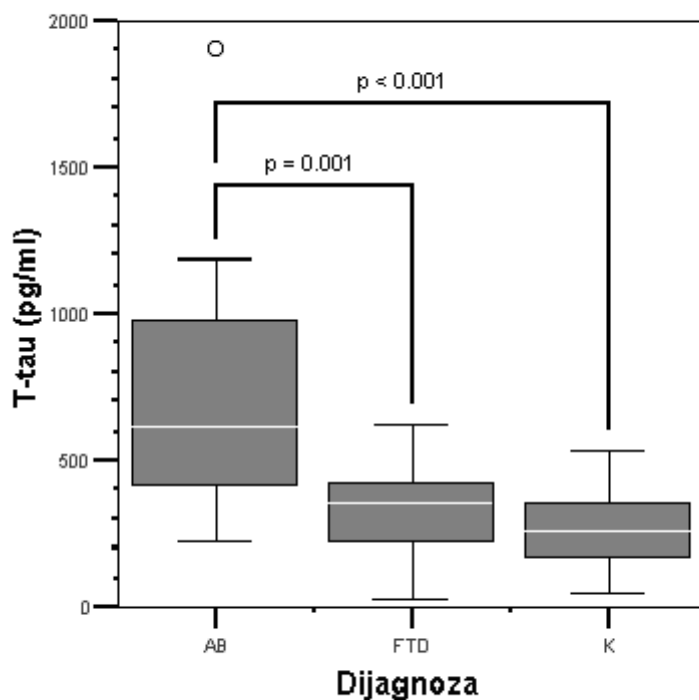
## **5.2 Vrijednosti markera t-tau, p-tau181 i p-tau199 po skupinama**

Vrijednosti t-tau markera iz likvora bile su statistički značajno više u skupini bolesnika s AB u odnosu na skupinu bolesnika s FTD, odnosno kontrolnu skupinu. Nadalje, nije nađena statistički značajna razlika za t-tau između skupine bolesnika s FTD i kontrolne skupine. S obzirom da se, u statističkom smislu, radilo o manjem broju ispitanika, za testiranje razlika ovog parametra primijenjeni su i neparametrijski (Mann-Whitney U test) i parametrijski (t-test) testovi. Oba su testa dala podudarne rezultate. Vrijednosti t-tau proteina prikazane su u tablici 6. te grafički na slici 7.

Tablica 6. Vrijednosti t-tau markera iz likvora (pg/ml) u sve tri ispitivane skupine (skupini bolesnika s AB i FTD te kontrolnoj skupini ispitanika)

	AB (n = 27)	FTD (n = 25)	K (n = 25)	Ukupno (n = 77)	AB vs. FTD	AB vs. K	FTD vs. K
Srednja vrijednost ± standardna devijacija (raspon), pg/ml	826,11 ± 650,06 (2615)	378,97 ± 298,97 (1386)	254,30 ± 124,99 (487)	495,28 ± 490,06 (2807)	T-test t = 3,144 st. sl. = 50 p = 0,003*	T-test t = 4,322 st. sl. = 50 p < 0,001*	T-test t = 1,924 st. sl. = 48 p = 0,060
Medijan 25.-75. percentila (interkvartilni raspon), pg/ml	614,0 404,0-978,0 (574)	351,00 206,0 – 435,5 (229,5)	251,0 150,0 – 350,0 (200,0)	352,0 220,0 – 581,5 (361,5)	U = 153,000 Z = -3,379 p = 0,001*	U = 83,000 Z = -4,661 p < 0,001*	U = 224,000 Z = -1,717 p = 0,086
Kolmogorov-Smirnov test	K-S d = 0,190 p = 0,284	K-S d = 0,206 p = 0,237	K-S d = 0,125 p = 0,830	K-S d = 0,211 p = 0,002*	M-W	M-W	M-W

AB = Alzheimerova bolest; FTD = frontotemporalna demencija; K = kontrolna skupina; M-W = Mann-Whitney U test; p\* statistički značajna razlika



Slika 7. Grafički prikaz vrijednosti t-tau markera iz likvora po ispitivanim skupinama. Rezultati su prikazani kao okvir dijagrami gdje bridovi okvira predstavljaju 25. i 75. percentilu, a njihova razlika interkvartilni raspon. Vodoravna crta unutar okvira predstavlja 50. percentilu (medijan). Na slici je kružićem prikazana vrijednost koja odstupa od ostalih podataka u skupini za 1,5 - 3 dužine okvira mjereći od kraja okvira te se naziva blago nepodoban član grupe (engl. mild outlier ili outlier). Vrijednosti t-tau markera iz likvora bile su statistički značajno više u skupini bolesnika s AB u odnosu na skupinu bolesnika s FTD, odnosno kontrolnu skupinu, dok isto nije nađeno između skupine bolesnika s FTD i kontrolne skupine. AB = Alzheimerova bolest; FTD = frontotemporalna demencija; K = kontrolna skupina; p = statistička značajnost

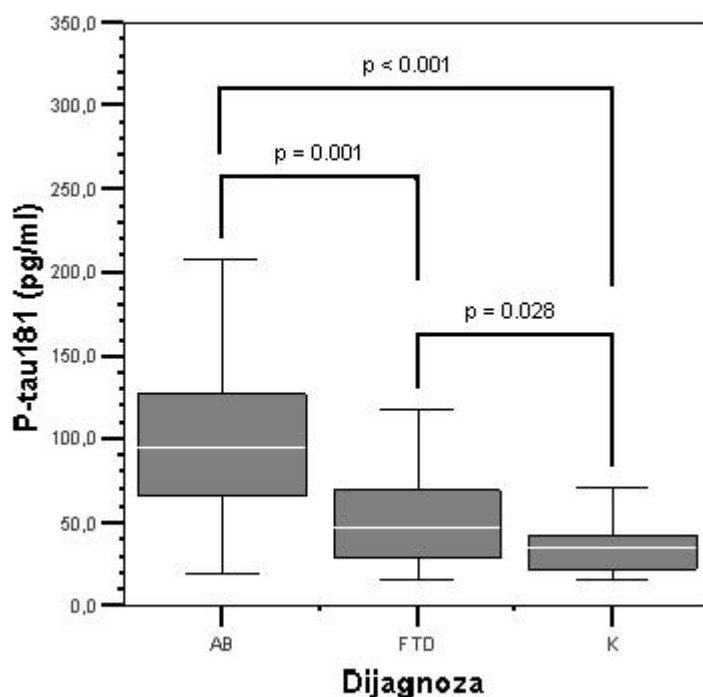
Vrijednosti markera p-tau181 iz likvora imale su normalnu raspodjelu. Ipak, budući da se u statističkom smislu radilo o manjem broju ispitanika, upotrijebljeni su i parametrijski (t-test) i neparametrijski (Mann-Whitney U) testovi. Rezultati oba testa bili su podudarni u razlikovanju bolesnika s AB prema bolesnicima s FTD, kao i razlikovanju bolesnika s AB

naspram ispitanika kontrolne skupine, budući da su vrijednosti p-tau181 markera iz likvora bile statistički značajno više u skupini bolesnika s AB u odnosu na skupinu bolesnika s FTD, te u skupini bolesnika s AB u usporedbi s ispitanicima kontrolne skupine. Pri razlikovanju bolesnika s FTD i ispitanika kontrolne skupine, t-test je ukazao na statistički značajnu razliku ( $p = 0,028$ ) za marker p-tau181, dok rezultat obrade ovog parametra neparametrijskim Mann-Whitney U testom nije dosegao statističku značajnost od 0,05 ( $p = 0,068$ ). Dodatno, pomoću Kolmogorov-Smirnovog testa uz Lilliefors korekciju uz dijagram normalne vjerojatnosti (engl. normal probability plot) nije odbačeno da su varijable normalno raspodijeljene. Stoga se prednost daje t-testu koji ima i veću statističku snagu, a ukazao je da su vrijednosti p-tau181 markera iz likvora bile statistički značajno više ( $p = 0,028$ ) u skupini bolesnika s FTD u odnosu na skupinu ispitanika kontrolne skupine. Podaci o vrijednostima p-tau181 proteina su prikazani u tablici 7. te grafički na slici 8.

Tablica 7. Vrijednosti p-tau181 markera iz likvora (pg/ml) u sve tri ispitivane skupine (skupini bolesnika s AB i FTD te kontrolnoj skupini ispitanika)

	AB (n = 27)	FTD (n = 25)	K (n = 25)	Ukupno (n = 77)	AB vs. FTD	AB vs. K	FTD vs. K
Srednja vrijednost ± standardna devijacija (raspon), pg/ml	96,02 ± 47,50 (188,8)	51,13 ± 28,75 (101,6)	35,87 ± 16,14 (54,2)	60,51 ± 41,46 (191,7)	T-test t = 3,939 st. sl. = 45 p < 0,001*	T-test t = 5,863 st. sl. = 45 p < 0,001*	T-test t = 2,267 st. sl. = 46 p = 0,028*
Medijan 25.-75. percentila (interkvartilni raspon), pg/ml	94,1 64,1-128,1 (64,0)	46,85 26,53 – 68,88 (42,35)	34,8 21,70 – 42,95 (21,25)	47,0 31,7 – 78,1 (46,4)	U = 116,500 Z = -3,395 p = 0,001*	U = 60,000 Z = -4,597 p < 0,001*	U = 199,500 Z = -1,825 p = 0,068
Kolmogorov- Smirnov test	K-S d = 0,117 p = 0,910	K-S d = 0,099 p = 0,941	K-S d = 0,122 p = 0,869	K-S d = 0,153 p = 0,071	M-W	M-W	M-W

AB = Alzheimerova bolest; FTD = frontotemporalna demencija; K = kontrolna skupina; M-W = Mann-Whitney U test; p\* statistički značajna razlika



Slika 8. Grafički prikaz vrijednosti p-tau181 markera iz likvora po skupinama. Rezultati su prikazani kao okvir dijagrami gdje bridovi okvira predstavljaju 25. i 75. percentilu, a njihova razlika interkvartilni raspon. Vodoravna crta unutar okvira predstavlja 50. percentilu (medijan). Vrijednosti p-tau181 markera iz likvora su bile statistički značajno više u skupini bolesnika s AB u odnosu na skupinu bolesnika s FTD, te u skupini bolesnika s AB u usporedbi s ispitanicima kontrolne skupine. Pri razlikovanju bolesnika s FTD i ispitanika kontrolne skupine, t-test je ukazao na statistički značajnu razliku ( $p = 0,028$ ) za marker p-tau181. AB = Alzheimerova bolest; FTD = frontotemporalna demencija; K = kontrolna skupina;  $p$  = statistička značajnost

Vrijednosti p-tau199 markera iz likvora bile su statistički značajno više u skupini bolesnika s AB u odnosu na skupinu bolesnika s FTD i kontrolnu skupinu. Nadalje, za p-tau199 nije nađena statistički značajna razlika između skupine bolesnika s FTD i kontrolne skupine. Iako je p-tau199 imao normalnu raspodjelu u sve tri skupine ispitanika, s obzirom da

se radilo o manjem broju ispitanika (u statističkom smislu), korišteni su i parametrijski (t-test) i neparametrijski (Mann-Whitney U) testovi čiji su rezultati bili podudarni. Podaci o vrijednostima p-tau199 proteina iz likvora su prikazani u tablici 8. te grafički na slici 9.

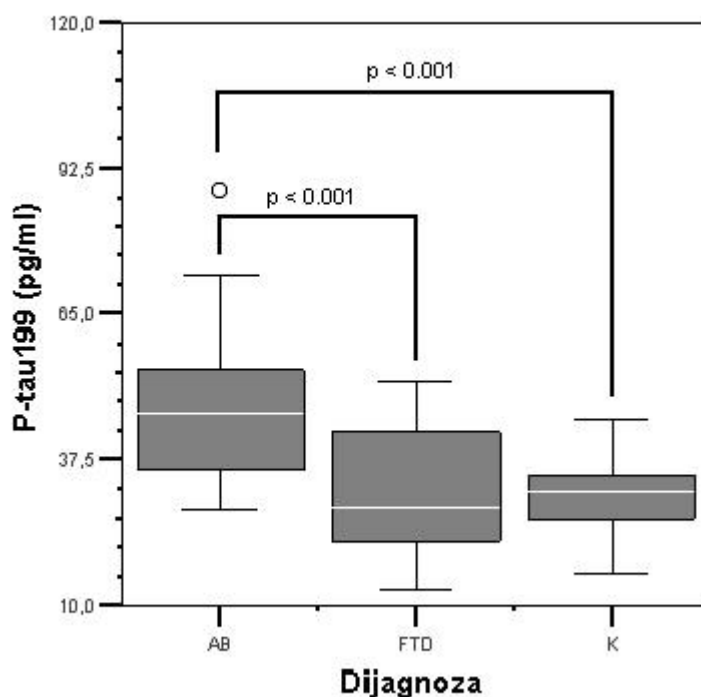
Tablica 8. Vrijednosti p-tau199 markera iz likvora (pg/ml) u sve tri ispitivane skupine (skupini bolesnika s AB i FTD te kontrolnoj skupini ispitanika)

	AB (n = 27)	FTD (n = 25)	K (n = 25)	Ukupno (n = 77)
Srednja vrijednost ± standardna devijacija (raspon), pg/ml	47,21 ± 14,78 (60,4)	31,64 ± 11,44 (39,3)	30,29 ± 7,48 (29,2)	36,75 ± 14,01 (75,6)
Medijan 25.-75. percentila (interkvartilni raspon), pg/ml	46,2 34,2 – 58,1 (23,9)	28,70 22,20 – 43,25 (21,05)	31,20 25,98 – 34,85 (8,87)	33,35 27,38 – 45,05 (17,67)
Kolmogorov-Smirnov test	K-S d = 0,140 p = 0,669	K-S d = 0,124 p = 0,836	K-S d = 0,089 p = 0,932	K-S d = 0,112 p = 0,300

AB vs. FTD	AB vs. K	FTD vs. K
T-test t = 4,222 st. sl. = 50 p<0,001*	T-test t = 5,056 st. sl. = 49 p<0,001	T-test t = 0,488 st. sl. = 47 p = 0,628
U = 134,500 Z = -3,719 p<0,001* M-W	U = 90,500 Z = -4,408 p<0,001* M-W	U = 288,500 Z = -0,230 p = 0,818 M-W

AB = Alzheimerova bolest; FTD = frontotemporalna demencija; K = kontrolna skupina; M-W = Mann-Whitney U test; p\* statistički značajna razlika





Slika 9. Grafički prikaz vrijednosti p-tau199 markera iz likvora po skupinama. Rezultati su prikazani kao okvir dijagrami gdje bridovi okvira predstavljaju 25. i 75. percentilu, a njihova razlika interkvartilni raspon. Vodoravna crta unutar okvira predstavlja 50. percentilu (medijan). Na slici je kružićem prikazana vrijednost koja odstupa od ostalih podataka u skupini za 1,5 - 3 dužine okvira mjereći od kraja okvira te se naziva blago nepodoban član grupe (engl. mild outlier ili outlier). Vrijednosti p-tau199 markera iz likvora bile su statistički značajno više u skupini bolesnika s AB u odnosu na skupinu bolesnika s FTD i kontrolnu skupinu. Nasuprot tome, nije nađena statistički značajna razlika između skupine bolesnika s FTD i kontrolne skupine. AB = Alzheimerova bolest; FTD = frontotemporalna demencija; K = kontrolna skupina; p = statistička značajnost

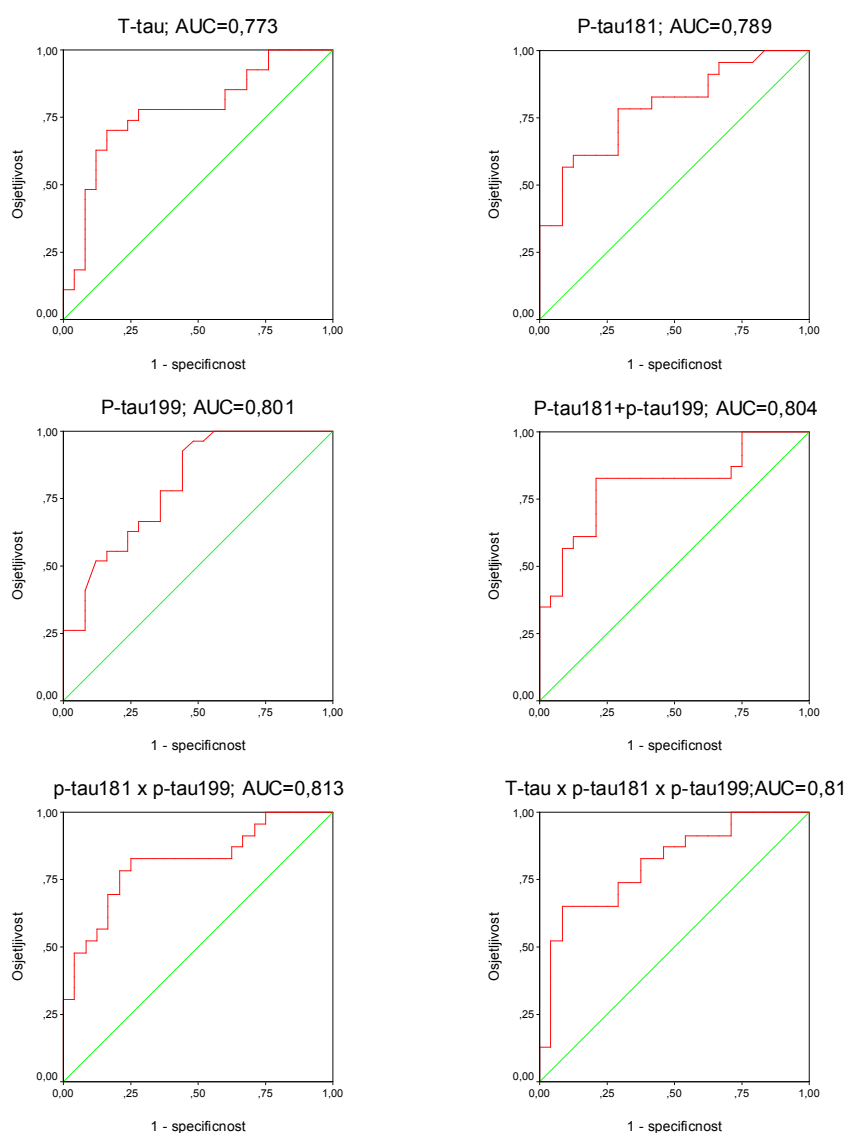
### 5.3 Osjetljivost i specifičnost ispitivanih markera iz likvora

Osjetljivost, specifičnost, granične vrijednosti, AUC i p-vrijednosti za svaki pojedini potencijalni marker/kombinaciju markera iz likvora pri razlikovanju bolesnika s AB i FTD su prikazani u tablici 9. Granične vrijednosti pojedinih markera iz likvora, odnosno kombinacija markera, izračunate su kao vrijednosti na ROC krivulji u kojoj je umnožak osjetljivosti i specifičnosti dosegao maksimum. Također su u tablici prikazane i specifičnosti markera ukoliko je osjetljivost postavljena iznad 85% (prema izvještaju radne grupe za markere (engl. Consensus Group on Molecular and Biochemical Markers of Alzheimer's disease; u daljnjem tekstu izvještaj radne grupe za markere).<sup>44</sup> Nadalje, slikovni prikazi ROC krivulja za razlikovanje bolesnika s AB i FTD uz vrijednost AUC predočeni su na slici 10. Sljedeći markeri/kombinacije markera su se pokazali statistički značajnim, a uz to imali visoku točnost (prema vrijednosti AUC) pri razlikovanju bolesnika s AB i FTD: t-tau, p-tau181, p-tau199, zbroj p-tau181 i p-tau199, razlika p-tau181 i p-tau199, umnožak p-tau181 i p-tau199 te umnožak svih triju markera (t-tau, p-tau181 i p-tau199). Iz tablice 9. je vidljivo da ni jedan marker/kombinacija markera iz likvora nije zadovoljio/la kriterij idealnog markera prema izvještaju radne grupe za markere,<sup>44</sup> tj. niti jedan nije postigao specifičnost veću od 85% ukoliko je osjetljivost bila postavljena na >85%. Najbliži idealnom markeru su bili p-tau199 (56,0%), umnožak triju markera (54,2%), te razlika p-tau181 i p-tau199 (50,0%). Izračunata specifičnost t-tau pritom je iznosila samo 40%, a p-tau181 još i manje (37,5%). Granične vrijednosti za tri markera iz likvora (t-tau, p-tau181 i p-tau199) na temelju ROC krivulje su iznosile: 500,0 pg/ml za t-tau, 63,45 pg/ml za p-tau181 te 30,3 pg/ml za p-tau199.

Tablica 9. Diskriminativne vrijednosti markera iz likvora te kombinacija markera u razlikovanju bolesnika s AB i FTD

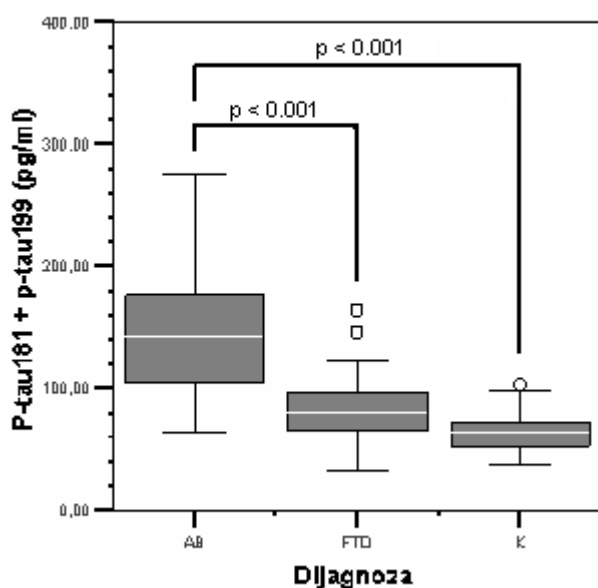
AB vs. FTD	AUC	p	Osjetljivost (%)	Specifičnost (%)	Granična vrijednost (pg/ml)	Diskriminativna snaga markera kad je osjetljivost >85%; Osjetljivost / specifičnost (%)
t-tau	0,773	0,001*	70,4	84,0	500,0	85,2 / 40,0
p-tau181	0,789	0,001*	78,3	70,8	63,45	87,0 / 37,5
p-tau199	0,801	<0,001*	92,6	56,0	30,30	92,6 / 56,0
P-tau181 / t-tau	0,493	0,932	69,6	45,8	0,1203	87,0 / 8,3
P-tau199 / t-tau	0,388	0,167	29,6	80,0	0,1336	85,2 / 0,0
P-tau181 / p-tau199	0,667	0,05	91,3	50,0	1,1891	87,0 / 50,0
P-tau181 + p-tau199	0,804	<0,001*	82,6	79,2	97,5	87,0 / 29,2
P-tau181 – p-tau199	0,746	0,004*	56,5	91,7	50,75	87,0 / 50,0
P-tau181 x p-tau199	0,813	<0,001*	82,6	75,0	2109,28	87,0 / 37,5
Umnožak triju markera	0,810	<0,001*	65,2	91,7	1700666,7	87,0 / 54,2

AB= Alzheimerova bolest; FTD = frontotemporalna demencija; AUC = površina ispod krivulje; p\* statistički značajna razlika

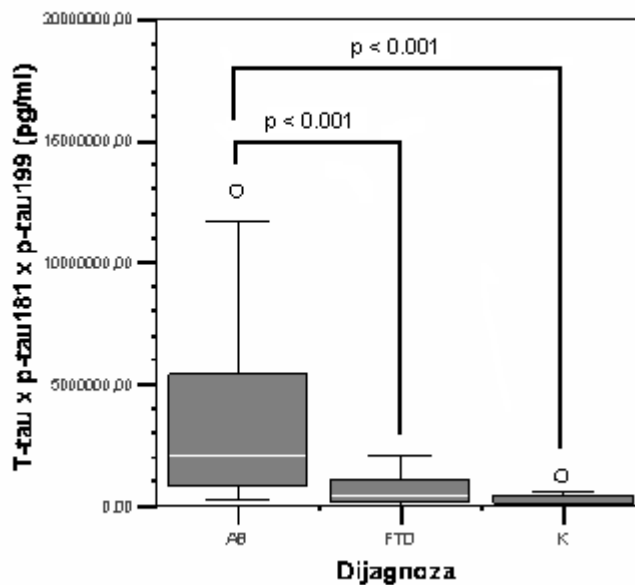


Slika 10. ROC krivulja za markere iz likvora i njihove kombinacije pri usporedbi bolesnika s AB i FTD. Dijagonalna linija ukazuje na područje u kojem ne postoji razlika u vrijednostima markera/kombinacije markera između skupina

Na slikama 11. i 12. prikazani su okvir dijagrami s vrijednostima kombinacija markera (zbroja p-tau181 i p-tau199, umnožak svih triju markera) koji su ROC analizom pokazali dobru razlučivost između skupina.



Slika 11. Vrijednosti zbroja p-tau181 i p-tau199 u bolesnika s AB, FTD i kontrolne skupine. Rezultati su prikazani kao okvir dijagrami gdje bridovi okvira predstavljaju 25. i 75. percentilu, a njihova razlika interkvartilni raspon. Vodoravna crta unutar okvira predstavlja 50. percentilu (medijan). Na slici je kružićem prikazana vrijednost koja odstupa od ostalih podataka u skupini za 1,5 - 3 dužine okvira mjereći od kraja okvira te se naziva blago nepodoban član grupe (engl. mild outlier ili outlier). Vrijednosti zbroja p-tau181 i p-tau199 markera iz likvora su bile statistički značajno više u skupini bolesnika s AB u odnosu na skupinu bolesnika s FTD, te u skupini bolesnika s AB u usporedbi s ispitanicima kontrolne skupine. AB = Alzheimerova bolest; FTD = frontotemporalna demencija; K = kontrolna skupina; p = statistička značajnost



Slika 12. Vrijednosti umnoška t-tau, p-tau181 i p-tau199 u bolesnika s AB, FTD i kontrolne skupine. Rezultati su prikazani kao okvir dijagrami gdje bridovi okvira predstavljaju 25. i 75. percentilu, a njihova razlika interkvartilni raspon. Vodoravna crta unutar okvira predstavlja 50. percentilu (medijan). Na slici je kružićem prikazana vrijednost koja odstupa od ostalih podataka u skupini za 1,5 - 3 dužine okvira mjereći od kraja okvira te se naziva blago nepodoban član grupe (engl. mild outlier ili outlier). Vrijednosti umnoška t-tau, p-tau181 i p-tau199 markera iz likvora su bile statistički značajno više u skupini bolesnika s AB u odnosu na skupinu bolesnika s FTD, te u skupini bolesnika s AB u usporedbi s ispitanicima kontrolne skupine. AB = Alzheimerova bolest; FTD = frontotemporalna demencija; K = kontrolna skupina; p = statistička značajnost

## 5.4 Korelacija kliničkih parametara i markera iz likvora po pojedinoj skupini

U tablici 10. su prikazani Spearmanovi koeficijenti korelacije ( $r$ ) između triju markera iz likvora (t-tau, p-tau181 i p-tau199) u tri ispitivane skupine (AB, FTD, K). U skupini bolesnika s AB i FTD nađena je statistički značajna pozitivna korelacija između varijabli t-tau i p-tau181 (u skupini bolesnika s AB  $r = 0,570$  uz  $p = 0,01$ ; u skupini bolesnika s FTD  $r = 0,694$  uz  $p = 0,01$ ). U kontrolnoj skupini ispitanika nije nađena statistički značajna korelacija među markerima iz likvora. Nadalje, uspoređivani su i ostali klinički parametri (spol, dob, broj MMSE bodova, duljina trajanja bolesti) po skupinama, te su statistički značajne korelacije prikazane u 5. stupcu tablice 10. U FTD skupini nađena je statistički značajna pozitivna korelacija između dobi bolesnika i trajanja bolesti ( $r = 0,558$ ,  $p = 0,01$ ), dok je u skupini zdravih ispitanika nađena statistički značajna negativna korelacija između vrijednosti p-tau199 i broja MMSE bodova ( $r = -0,516$ ,  $p = 0,01$ ).

Tablica 10. Korelacija između ispitivanih markera iz likvora u bolesnika s AB, FTD i ispitanika kontrolne skupine. Zadnji stupac prikazuje statistički značajne korelacije kliničkih parametara (dob, spol, broj MMSE bodova, trajanje bolesti) s markerima iz likvora unutar ispitivanih skupina.

Skupina	T-tau x p-tau181	T-tau x p-tau199	P-tau181 x p-tau199	Ostale kliničke varijable
AB	0,570*	0,265	0,333	/
FTD	0,694*	0,334	0,352	Trajanje bolesti x dob 0,558*
K	0,118	-0,142	-0,197	MMSE x p-tau199 -0,516*

Vrijednosti prikazane kao Spearmanov koeficijent ( $r$ ); AB = Alzheimerova bolest; FTD = frontotemporalna demencija; K = kontrolna skupina; MMSE = Skala minimalnog mentalnog statusa, engl. Mini Mental Status Examination (broj bodova); \* značajnost korelacije na razini 0,01

Uzimajući u obzir činjenicu da je kontrolna skupina ispitanika bila statistički značajno mlađa od skupine bolesnika s AB i FTD, učinjena je i usporedba dobi i izmjerenih koncentracija

ispitivanih markera iz likvora. Navedenom usporedbom nije nađena statistički značajna korelacija, tj. nije se moglo zaključiti da bi stariji ispitanici kontrolne skupine imali više vrijednosti ispitivanih markera od mlađih ispitanika kontrolne skupine, odnosno vrijednosti ispitivanih markera iz likvora nisu ovisile o dobi ispitanika kontrolne skupine.

Ispitivanjem razlika kliničkih parametara i triju markera iz likvora u pojedinim skupinama bolesnika/ispitanika nisu nađene statistički značajne razlike vezane za spol. S obzirom da se radilo o malim uzorcima u kojima neke od varijabli nisu slijedile normalnu raspodjelu korišten je neparametrijski Mann-Whitney test. Rezultati su prikazani u tablicama 11., 12. i 13.

Tablica 11. Statistička značajnost razlika kliničkih parametara i markera iz likvora između muških i ženskih ispitanika u skupini bolesnika s AB

	<b>Dob</b>	<b>MMSE</b>	<b>Trajanje</b>	<b>T-tau</b>	<b>P-tau181</b>	<b>P-tau199</b>
U	87,500	63,500	30,000	87,000	50,000	76,000
Z	-0,025	-,745	-0,276	-,049	-,819	-,593
p	0,981	0,467	0,878	0,981	0,439	0,577

U i Z su vrijednosti Mann-Whitney U testa

Tablica 12. Statistička značajnost razlika kliničkih parametara i markera iz likvora između muških i ženskih ispitanika u skupini bolesnika s FTD

	<b>Dob</b>	<b>MMSE</b>	<b>Trajanje</b>	<b>T-tau</b>	<b>P-tau181</b>	<b>P-tau199</b>
U	71,000	58,000	23,500	76,000	49,500	45,500
Z	-,328	-1,049	-1,492	-,055	-1,275	-1,726
p	0,767	0,317	0,236	0,979	0,207	0,085

U i Z su vrijednosti Mann-Whitney U testa

Tablica 13. Statistička značajnost razlika kliničkih parametara i markera iz likvora između muških i ženskih ispitanika u kontrolnoj skupini

	<b>Dob</b>	<b>MMSE</b>	<b>T-tau</b>	<b>P-tau181</b>	<b>P-tau199</b>
U	62,500	55,500	73,500	47,000	69,500
Z	-,522	-1,332	-,245	-1,419	-,116
p	0,608	0,225	0,810	0,167	0,910

U i Z su vrijednosti Mann-Whitney U testa



## 5.5 Kombinacije kliničkih parametara i markera iz likvora

U modelu logističke regresije koji je korišten u predviđanju bolesnika s dijagnozom AB korišteno je sedam prediktorskih varijabli (spol, dob početka simptoma, broj MMSE bodova, trajanje bolesti, t-tau, p-tau181 i p-tau199). Dobivene su statistički značajne predikcije ( $\chi^2 = 35,668$ , st. sl. = 7,  $p < 0,001$ ), što znači da je najmanje jedna od prediktorskih varijabli statistički značajno povezana s kriterijskom varijablom. Prediktori koji su pozitivno povezani s dijagnozom AB bili su: vrijednosti **t-tau > 500,0 pg/ml** (OR = 18,37; označava koliko je puta vjerojatnije da će bolesnici s t-tau višim ili jednakim 500,0 pg/ml biti bolesnici s AB u odnosu na one s t-tau < 500,0 pg/ml), vrijednosti **p-tau181 > 63,45 pg/ml** (OR = 11,31) te vrijednosti **p-tau 199 > 30,30 pg/ml** (OR = 18,75). Rezultati su prikazani u tablici 14.

Tablica 14. Prediktori povezani s dijagnozom AB – logistička regresija

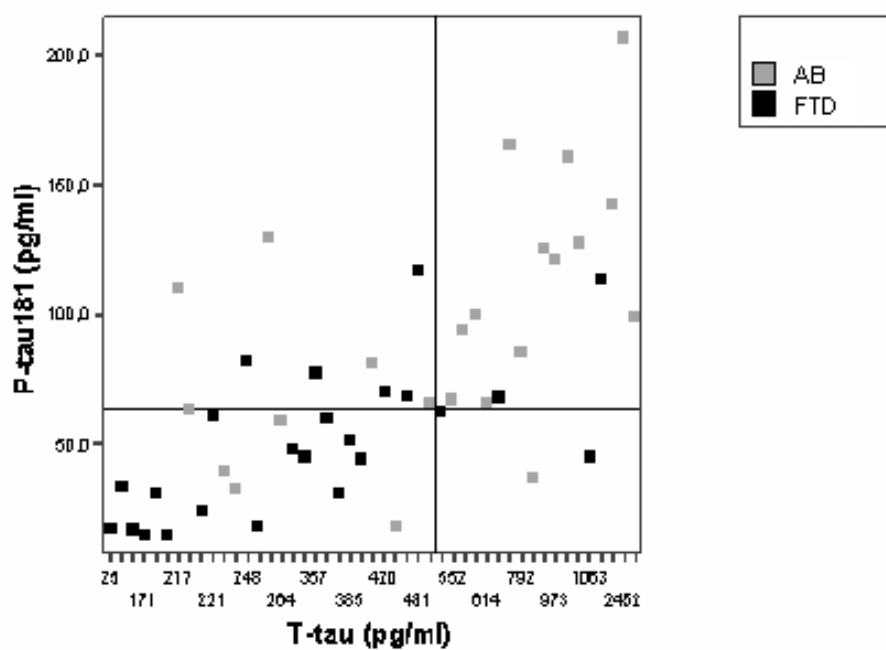
	<b>Postotak bolesnika s postavljenom dijagnozom AB</b>	<b>OR</b>	<b>95% interval pouzdanosti</b>	<b>P</b>
<b>Dob početka bolesti</b>				
Do 65,0 godina [Por.]	19,2	1,00		
Nakon 65,1 godine	32,7	1,25	0,40-3,94	0,703
<b>Spol bolesnika</b>				
Muškarci [Por.]	30,8	1,00		
Žene	21,2	0,88	0,29-2,63	0,812
<b>MMSE</b>				
20-30 [Por.]	36,5	1,00		
1-19	15,4	0,21	0,04-1,09	0,063
<b>Trajanje bolesti</b>				
Manje ili jednako 2 godina [Por.]	44,2	1,00		
Više od 2 godine	7,7	0,70	0,16-2,95	0,623
<b>Vrijednosti t-tau</b>				
Manje od 500,0 [Por.]	11,5	1,00		
Više ili jednake 500,0	40,4	18,37	4,52-74,66	<0,001
<b>Vrijednosti p-tau181</b>				
Niže od 63,45 [Por.]	9,6	1,00		
Više ili jednake 63,45	42,3	11,31	3,07-41,76	<0,001
<b>Vrijednosti p-tau199</b>				
Niže od 30,30 [Por.]	3,8	1,00		
Više ili jednake 30,30	48,1	18,75	3,61-97,40	<0,001

Por. = poredbena grupa

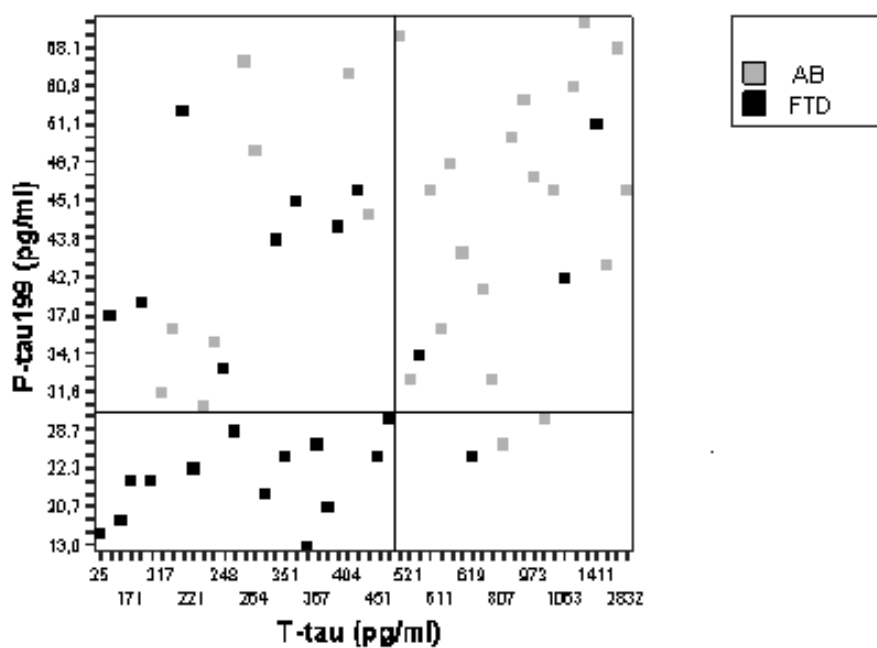
Logističkom regresijskom analizom s dijagnozom (AB ili FTD) kao zavisnom varijablom te svih sedam prethodno navedenih prediktorskih varijabli kao nezavisnim varijablama dobivena je točna klasifikacija 23 od 27 (85,19%) bolesnika s AB te 18 od 25 (72,0%) bolesnika s FTD. Ukoliko pri logističkoj regresijskoj analizi i upotrebi iste zavisne varijable (dijagnoza AB ili FTD) koristimo vrijednosti t-tau i p-tau199 kao nezavisne varijable dobivamo točnost klasifikacije bolesnika s FTD od 88%, tj. 22 od 25 bolesnika s FTD budu točno klasificirana. Dodavanje drugih varijabli u model nije dovelo do povećanja točnosti klasifikacije bolesnika s FTD.

Na slici 13. je grafički prikaz vrijednosti p-tau181 i t-tau, a na slici 14. p-tau199 i t-tau u bolesnika s FTD i AB podudarnih dobnih skupina. Okomite i vodoravne crte prikazuju granične

vrijednosti dobivene ROC analizom. Tamnom bojom su označene vrijednosti kod bolesnika s FTD, dok svijetli kvadratići predstavljaju markere kod bolesnika s AB. Iz slike 14. jasno je vidljivo da niti jedan bolesnik s AB nije imao oba markera (i p-tau199 i t-tau) ispod graničnih vrijednosti.



Slika 13. Grafički prikaz vrijednosti p-tau181 i t-tau u bolesnika s AB i FTD podudarnih dobnih skupina. Okomita i vodoravna linija predstavljaju granične vrijednosti dobivene ROC analizom. Tamni kvadratići predstavljaju vrijednosti bolesnika s FTD, a svijetli bolesnika s AB.



Slika 14. Grafički prikaz vrijednosti p-tau199 i t-tau u bolesnika s AB i FTD podudarnih dobnih skupina. Okomita i vodoravna linija predstavljaju granične vrijednosti dobivene ROC analizom. Tamne točke predstavljaju vrijednosti bolesnika s FTD, a svijetle bolesnika s AB. Na slici je vidljivo da niti jedan bolesnik s AB nije imao oba markera (i p-tau199 i t-tau) ispod graničnih vrijednosti.

## 6. RASPRAVA

U ovom su istraživanju uspoređivane vrijednosti triju potencijalnih biomarkera iz likvora (t-tau, p-tau181 i p-tau199) među bolesnicima s AB i FTD te ispitanicima kontrolne skupine. Rezultati su pokazali statistički značajnu razliku za sva tri biomarkera iz likvora koja doprinosi razlikovanju bolesnika s AB i FTD, te razlikovanju bolesnika s AB i ispitanika kontrolne skupine. Rezultati dobiveni za t-tau i p-tau181 u tom se pogledu podudaraju s prethodno objavljenim rezultatima.<sup>192,195,198</sup> Nadalje, nađena je statistički značajna razlika koncentracija p-tau181, no ne i t-tau i p-tau199 biomarkera, između bolesnika s FTD i ispitanika kontrolne skupine. Do sada je predložen veći broj hipoteza kojima se pokušavaju objasniti snižene vrijednosti sva tri navedena markera u likvoru bolesnika s FTD u usporedbi s onima koje imaju bolesnici s AB. Jedno od mogućih objašnjenja „okrivljuje“ nemogućnost izlaska tau proteina iz živčanih stanica u izvanstanični prostor, jer se oni nalaze „zarobljeni“ u tzv. kromatolitičnim, baloniranim stanicama (engl. balloon cells) i Pickovim tjelešcima, što je do sada uvjerljivo demonstrirano u skupini bolesnika s CBD fenotipom.<sup>199</sup> Druga interpretacija naglašava heterogenost patologije FTD-e uz postojanje tau, ali i drugih (DLDH ili ubikvitin pozitivnih) oblika patoloških promjena u kojima su vrijednosti tau proteina u mozgu smanjene.<sup>180,181</sup> Treće objašnjenje temelji se na anatomskim razlikama u lokalizaciji i opsegu neurodegenerativnog procesa. Dok u AB neurodegenerativni proces posebice zahvaća hipokampalnu formaciju koja je smještena na dnu donjeg roga lateralnih ventrikula, dakle u neposrednoj blizini ventrikularnog sustava, pa se otuda tau protein može otpuštati iz umirućih stanica i ulaziti u likvor, kod FTD je, barem u početnom stadiju, patološki proces lokaliziran u kortikalnim područjima udaljenim od ventrikularnog sustava, pri čemu je logično pretpostaviti slabije dopiranje tau proteina do likvora. Ova hipoteza temelji se na istraživanjima kojima je promatran topografski učinak na koncentracije proteina u likvoru korištenjem proteina  $\beta$ -obilježivača (engl. beta-trace protein).<sup>200,201</sup> Pored toga, u prilog upravo ovoj hipotezi govori i činjenica da između intersticija

mozga i likvora ne postoje čvrste veze (engl. tight junctions), što dopušta slobodnu difuziju izvanstaničnih niskomolekularnih proteina (kao što je tau protein) u likvor.<sup>202</sup>

Dosadašnji rezultati studija koje su istraživale vrijednosti ukupnog tau proteina te fosforiliranih tau proteina iz likvora u razlikovanju AB i FTD bili su vrlo varijabilni, vjerojatno kao posljedica širokog raspona koncentracija tau proteina nađenih u mozgu bolesnika s FTD pri obdukciji.<sup>179-181</sup> Ovdje prikazani rezultati povišenih vrijednosti t-tau i p-tau181 iz likvora u bolesnika s AB u usporedbi s nalazom istih kod bolesnika s FTD podudarni su s prethodno objavljenim studijama.<sup>182,183,190</sup> Povišene vrijednosti tih biomarkera vjerojatno su posljedica pozitivne korelacije koja postoji između tau proteina u likvoru i broja NFS.<sup>203</sup> Blago povišene vrijednosti t-tau i p-tau181 nađene u bolesnika s FTD opažene su i u prethodnim studijama.<sup>185,189</sup> Razmjerno više vrijednosti t-tau u bolesnika s AB naspram FTD s tau mutacijom mogle bi biti posljedica nespecifične, ali opsežnije degeneracije živčanih stanica i njihovih aksona, a ne samo neurofibrilarne patologije. Stoga, samo postojanje tau patologije u mozgu bolesnika s FTD, što se prethodno mislilo,<sup>204</sup> ne znači nužno više vrijednosti t-tau u likvoru kao što je i dokumentirano u studiji na FTD bolesnicima s pozitivnom tau mutacijom ili bolesnicima s PSP.<sup>194,205</sup> Slično je pokazano i za p-tau181 u FTD bolesnika s pozitivnom tau mutacijom.<sup>190</sup> U našem je istraživanju samo jedan od četiri bolesnika s PNFA imao povišene vrijednosti t-tau i p-tau181 što nije neočekivano ako se ima na umu izrazita patohistološka heterogenost PPA. Preostala tri bolesnika s PNFA su imali koncentracije sva tri promatrana markera ispod graničnih vrijednosti, a ovakav je nalaz za t-tau kod bolesnika s PNFA već objavljen.<sup>206</sup> Također, od svih bolesnika s FTD koji su promatrani u ovoj studiji, samo je jedan imao sva tri ispitivana markera iznad graničnih vrijednosti (engl. cut-off values) koje su većinom nađene u bolesnika s AB.

Usprkos statistički značajnim razlikama svih triju ispitivanih markera iz likvora pri razlikovanju bolesnika s AB i FTD, ROC analiza je pokazala da nijedan nije zadovoljio kriterije

idealnog markera prema izvještaju radne skupine za markere (koji zahtjeva da je osjetljivost markera iznad 85%, dok bi specifičnost idealno trebala iznositi 75-85% pa i više).<sup>44</sup> U ovom istraživanju se najbliži ispunjenju kriterija idealnog markera za razlikovanje bolesnika s AB i FTD pokazao p-tau199, koji je postigao osjetljivost 92,6% i specifičnost 56,0% uz visoku vrijednost AUC (0,801). Osjetljivost/specifičnost za t-tau iznosile su 85,2% / 40,0%, dok su ove vrijednosti za p-tau181 bile neočekivano niske (87,0% / 37,5%) usprkos boljoj vrijednosti AUC za p-tau181 (0,789) u usporedbi s t-tau (0,773). Drugim riječima, unatoč sveukupno dobivenoj značajnoj razlici svih ispitivanih markera pri razlikovanju bolesnika s AB i FTD, preklapanje vrijednosti između ovih dviju skupina rezultiralo je njihovom relativno nižom specifičnosti (manjom od idealne). Iz toga se može zaključiti da ispitivani markeri nisu, sami za sebe primjereni za individualno postavljanje dijagnoze primarnog uzroka demencije (AB ili FTD). Manju učinkovitost od očekivane u diferenciranju bolesnika s AB i FTD djelomično bi se moglo objasniti prethodno spomenutom heterogenošću patoloških promjena u FTD, što je vjerojatni razlog visokih vrijednosti ukupnog tau proteina u nekih bolesnika s FTD. Naime, u četiri od 25 bolesnika s FTD su vrijednosti t-tau bile više od granične vrijednosti (500 pg/ml). Osim toga, visoke vrijednosti p-tau181 (>63,45 pg/ml) su nađene u sedam od 25 FTD bolesnika, a p-tau199>30,30 pg/ml u 10 od 25 FTD bolesnika. Niska specifičnost ispitivanih markera u diferenciranju bolesnika s AB i FTD prvenstveno je bila posljedica lažno pozitivnih nalaza sva tri markera kod bolesnika s FTD, a u znatno manjoj mjeri lažno negativnih nalaza kod bolesnika s AB (6/27 za t-tau, 5/27 za p-tau181 te 2/27 za p-tau199). Velik broj lažno pozitivnih nalaza bi se jednim dijelom mogao objasniti i spoznajom da je u 15-33% bolesnika s klinički dokazanom FTD naposljetku patološki potvrđena AB.<sup>135,161,171,172,207-209</sup> Usprkos tome, nekonzistentnost rezultata t-tau, ali i A $\beta$  je nađena i kod bolesnika s patološki verificiranom AB i FTD.<sup>188,210,211</sup>

S obzirom da je retrospektivna neuropatološka studija pokazala da trenutno korišteni kriteriji za AB (NINCDS-ADRDA kriteriji) imaju nisku specifičnost za razlikovanje bolesnika s



AB i FTD (samo 23%),<sup>176</sup> pronalaženje biomarkera za razlikovanje bolesnika s AB i FTD, ali i drugih primarnih uzroka demencija, je od izuzetne važnosti što je pokazano i brojnim do sada objavljenim studijama u kojima su promatrane vrijednosti različitih potencijalnih biomarkera (A $\beta$ 42, t-tau, fosforilirani tau proteini, neurofilamentni proteini (lakog i teškog lanca), GAP-43, izoprostan i dr.) u bolesnika s AB i FTD. Određivanjem vrijednosti koncentracija fosforiliranog tau proteina (fosforiliranih na epitopima važnim za promjene konformacije molekule) u likvoru pospješuje se razlikovanje AB i FTD,<sup>212</sup> pogotovo ukoliko se ovi podaci kombiniraju s nekim drugim parametrom iz likvora.<sup>192,193,212</sup> Zbog kontradiktornih rezultata niti jedan biomarker zasebno nije ušao u smjernice za diferencijalnu dijagnozu AB i FTD niti u kliničku primjenu. Stoga se iz prethodnih studija zaključilo da bi kombinacija markera mogla biti „ideal“ za diferencijaciju.<sup>115</sup> Uz dva važna izuzetka, u ovom istraživanju kombinacije pojedinih markera (omjeri, zbrojevi i sl.) u pravilu nisu pokazale bolju diferencijaciju (veću specifičnost i osjetljivost) bolesnika s AB naspram bolesnika s FTD odnosno ispitanika kontrolne skupine u usporedbi s individualnim markerom. Prvi izuzetak je bila kombinacija markera (umnožak p-tau181 i p-tau199) zbog svoje superiornosti naspram pojedinačnim markerima pri razlikovanju bolesnika s AB i ispitanika kontrolne skupine. Također, upotrebom logističke regresijske analize, pokazano je da je istodobnom upotrebom t-tau i p-tau199 točno klasificirano 88% bolesnika s FTD, tj. kombinacija vrijednosti t-tau<500 pg/ml uz vrijednosti p-tau199<30,30 pg/ml dovela je do točne klasifikacije 22 od 25 bolesnika s FTD, što znači da je i u ovom, drugom izuzetku, kombinacija markera bila točnija u postavljanu dijagnoze FTD u usporedbi s pojedinačnim markerom.

Do sada je provedeno nekoliko studija s ciljem pronalaska biomarkera za pouzdano razlikovanje AB i FTD podudarnih dobnih skupina u kojima su među ostalima korišteni različiti tau i fosforilirani tau proteini.<sup>183,190-192,195,198,212</sup> Izvrsna osjetljivost i specifičnost postignuta je u studiji Buregera i sur.<sup>212</sup> upotrebom p-tau231 (tau protein fosforiliran na treoninu 231). Ista je

skupina autora pokazala važnost potpune dobne podudarnosti između AB i FTD grupe jer su koncentracije p-tau231 iz likvora bile u izravnoj korelaciji sa starošću bolesnika s depresijom.<sup>213</sup> Nadalje, potrebno je još jednom naglasiti da ni u prethodnim studijama niti jedan marker *per se* nije zadovoljio kriterije idealnog markera, odnosno nađene su statistički značajne razlike pojedinih biomarkera između skupina, no osjetljivost i specifičnost ipak nisu zadovoljavale kriterije koje je postavila radna skupina za markere. U studiji Schoonenbooma i sur.<sup>192</sup> vrijednost kombinacije A $\beta$ 42 i tau proteina fosforiliranog na treoninu 181 pokazala je dobru (no ne i idealnu) razlučivost između AB i FTD podudarnih dobnih skupina (uz osjetljivost 72% i specifičnost 93%). Logističkom regresijskom analizom u istoj studiji je dobivena točna klasifikacija 98% bolesnika s AB te 82% FTD bolesnika istodobnim korištenjem obaju gore navedenih markera. U studiji de Jonga i sur.<sup>195</sup> tek je kombinacija ukupnog tau proteina, tau proteina fosforiliranog na treoninu 181 te neurofilamentnog proteina lakog lanca dostigla zadovoljavajuću dijagnostičku točnost uz osjetljivost 86% i specifičnost 100%. Među rijetkim studijama koje su neuropatološki odnosno genetskim testiranjem potvrdile klinički postavljene dijagnoze je i studija Biana i sur.<sup>211</sup> u kojoj su promatrani t-tau i A $\beta$ 42 iz likvora kod bolesnika s AB i FTD. Najbolji rezultat pri diferenciranju tih dviju skupina pokazao je omjer t-tau i A $\beta$ 42 koji usprkos visokom AUC (0,93) nije zadovoljio uvjete radne skupine za markere uz nađenu osjetljivost od 78,9% te specifičnost od 96,6%.

Tijekom progresije AB dolazi do fosforilacije tau proteina na gotovo bilo kojoj serinskoj ili treoninskoj hidroksilnoj skupini. Ipak, detaljnim proučavanjem „ponašanja“ tau proteina unutar NFS nađeni su brojni izooblici koji su se razlikovali u poziciji abnormalne hiperfosforilacije. Istraživanjem raspodjele različitih hiperfosforiliranih oblika tau proteina vezanih uz stadij AB nađeno je da je hiperfosforilacija na određenom epitopu zapravo karakteristična za određeni stadij AB.<sup>214</sup> Tako se hiperfosforilacija na treoninu 181 i 231 događa u fazi koja prethodi nastanku NFS u kojoj se nalaze samo punktiformne neurofibrilarne

unutarstanične nakupine. Za razliku od toga, fosforilacija tau proteina na serinu 199 događa se u kasnijoj fazi AB, tj. u stadijima unutar-neuronalnih i izvan-neuronalnih (onih koje ostaju u neuropilu nakon smrti neurona) NFS. Tijekom progresije bolesti dolazi do pojavljivanja novih fosforiliranih tau epitopa koji nastaju postepenom aktivacijom kinaza. Tako je poznato da p-tau199 može nastati djelovanjem nekoliko različitih kinaza, dok samo izvanstanična kinaza 2 fosforilira tau molekulu na mjestu 181. Za razliku od prethodno opisane studije u kojoj se tau fosforilira na serinu 199 tek u kasnijem stadiju AB, druga studija je pokazala da fosforilacija na serinu 199 nastaje već u ranoj fazi bolesti, tj. prije nastajanja NFS čime je p-tau199 dodatno dobio na važnosti kao potencijalno važan marker za ranu dijagnostiku AB.<sup>215</sup> U studiji u kojoj smo uz p-tau199 promatrali vrijednosti ukupnog tau proteina te p-tau181, p-tau199 je pokazao bolju specifičnost u razlikovanju bolesnika s AB i VaD od p-tau181.<sup>216</sup> Tau protein fosforiliran na serinu 199 u bolesnika s AB i FTD istraživan je do sada samo u dvije studije.<sup>118,194</sup> Iako je u obje studije nađena statistički značajna razlika u p-tau199 pri razlikovanju bolesnika s AB i FTD (više vrijednosti u bolesnika s AB naspram FTD), bolesnici su bili nepodudarnih dobnih skupina (AB skupina statistički značajno starija od FTD skupine) zbog čega je adekvatna interpretacija rezultata bila nemoguća. Povrh toga, u studiji Itoha i sur.,<sup>194</sup> kao i u našem istraživanju, nije nađena razlika u koncentracijama p-tau199 između muških i ženskih ispitanika u kontrolnoj skupini. Međutim, za razliku od našeg istraživanja, nađena je statistički značajna razlika u vrijednostima p-tau199 između FTD skupine (povećane vrijednosti) i kontrolne skupine ispitanika (niže vrijednosti) što zapravo može biti posljedica statistički značajne dobne razlike ovih skupina. Pozitivna korelacija između t-tau i p-tau199 u skupini AB i FTD bolesnika nađena u studiji Itoha i suradnika nije nađena u našem istraživanju. S druge strane, u našem je istraživanju nađena negativna korelacija između broja MMSE bodova i koncentracije p-tau199 u kontrolnoj skupini ispitanika. Sličan trend nije uočen u AB ili FTD skupini bolesnika. Uz nepodudarnu dob bolesnika u AB i FTD skupini bolesnika, u odnosu na naše istraživanje, veliki je nedostatak studije Itoha i suradnika i nepostojanje ROC analize pa nije razvidno je li p-tau199

zadovoljio kriterije idealnog markera za razlikovanje AB i FTD. Naime, u studiji Itoha i suradnika određene su jedino osjetljivost i specifičnost u razlikovanju bolesnika s AB od ne-AB vrsta demencija, koje su iznosile 85,2% i 85,0% (te time ispunile kriterije idealnog markera za razlikovanje tih dviju skupina), no isto nije izračunato za razlikovanje AB od drugih tauopatija (u radu stoji samo napomena da bi u ovom slučaju specifičnost prema njihovim rezultatima mogla biti dosta manja). Navedeno potkrepljuje i činjenica da se među patološkim tau izooblicima pročišćenim iz postmortalnih uzoraka mozгова bolesnika s tauopatijama povremeno može pronaći i tau hiperfosforiliran na serinu 199.<sup>217,218</sup>

Relativno visoke vrijednosti p-tau199 u ispitanika kontrolne skupine, a time i nepostojanje statistički značajne razlike između bolesnika s FTD i kontrolne skupine moglo bi se objasniti činjenicom da je normalni tau protein izoliran iz biopsijom dobivenih uzoraka mozga odraslog čovjeka hiperfosforiliran na gotovo istim mjestima kao i PHF-tau iz mozgov bolesnika s AB.<sup>219</sup> Drugo logično objašnjenje bi moglo biti da su ispitanici kontrolne skupine s povišenim vrijednostima p-tau199 zapravo u pretkliničkoj fazi AB (a zbog čega su klinički simptomi još nedovoljno izraženi). U jednoj drugoj studiji što je promatrala koncentracije tri fosforilirana tau epitopa (p-tau 231, p-tau181 i p-tau199)<sup>118</sup> postojala je značajna razlika u dobi bolesnika s AB i FTD. Za p-tau 199 je nađena, kao i u našoj studiji, statistički značajna razlika za razlikovanje bolesnika s AB i FTD uz sličnu specifičnost kakvu smo dobili i u našoj studiji (42-54%). U navedenoj je studiji model s dva markera (p-tau231 i p-tau181) najbolje razlikovao bolesnike s AB naspram FTD (uz 85,0% točnost), no FTD je pri tome bila promatrana u većoj skupini zajedno s DLDB i VaD, a ne zasebno.

U ovom istraživanju nije nađena korelacija ispitivanih markera (t-tau, p-tau181 i p-tau199) i stupnja demencije (ocijenjenih pomoću MMSE) u dvije skupine bolesnika (AB i FTD). Drugim riječima, teži stupnjevi bolesti i veća rasprostranjenost patološkog procesa nisu nužno

doveli i do viših vrijednosti ovih markera u likvoru. Zanimljivo je da je u AB i FTD skupini bolesnika nađena korelacija između vrijednosti koncentracija t-tau i p-tau181. Slična pozitivna korelacije je već pokazana u prethodnim studijama za bolesnike s AB, FTD i ispitanike kontrolne skupine.<sup>192</sup> Iz toga bi se moglo zaključiti da se p-tau181 kod bolesnika s AB ili drugih tauopatija otpušta u likvor iz umirućih neurona koji su podlegli abnormalnoj hiperfosforilaciji tau proteina. Statistički značajna korelacija između dobi ispitanika kontrolne skupine i koncentracije t-tau koja je nađena u prethodnim studijama, u našoj studiji nije nađena.<sup>220,221</sup>

Dva su moguća nedostatka ove studije: 1) relativno mali broj bolesnika uključen u istraživanje te 2) nedostatak postmortalne histopatološke verifikacije dijagnoza postavljenih na temelju kliničkih kriterija. Ta dva faktora bi mogla objasniti relativnu disperziju rezultata među skupinama koja je nađena za pojedine markere. Maleni broj bolesnika uključenih u studiju diktiran je malom pojavnosti AB i FTD mlađih životnih skupina (što je detaljno objašnjeno u uvodu). Pregledom članaka objavljenih u renomiranim neurološkim časopisima vidljivo je da su i u vodećim centrima koja proučavaju markere u likvoru kod razlikovanja AB i FTD podudarne dobi, brojevi bolesnika po skupinama mali, čak i ukoliko se prikazuju udruženi iz više centara.<sup>183,190,192,198</sup> Drugi nedostatak (nepostojanje patohistološke verifikacije dijagnoze postavljene na temelju kliničkih kriterija), također je prisutan u gotovo svim prethodno publiciranim radovima, čak i u centrima koja imaju dobre razrađene programe postmortalne donacije moždanog tkiva u tzv. „banke mozgova“. U našoj zemlji to načelo nije ustaljeno, te se postmortalni nalaz dobiva jedino ukoliko bolesnik umre u bolnici i naknadno bude obduciran. Ipak, mislimo da nedostatak patohistološke verifikacije nije toliko izražen problem jer se obradom svakog bolesnika pokušala postići maksimalna uniformnost (tj. da se svakom bolesniku provedu iste pretrage) i informativnost (opširnijom dijagnostičkom obradom, npr. upotrebom neuropsihološkog testiranja, praćenja bolesnika, itd.). Poznato je da NINCDS-ADRDA kriteriji

imaju visoku osjetljivost, no srednje visoku specifičnost pa bi se opširnijom dijagnostičkom obradom specifičnost dijagnoze povećala.<sup>222</sup>

Prema našim spoznajama, ovo je prva studija koja je koristila sva tri navedena markera iz likvora, te prva koja je koristila p-tau199 u dobno podudarnim skupinama bolesnika s AB i FTD. S obzirom da je ovo istraživanje ipak napravljeno na relativno maloj skupini bolesnika (slično ostalim do sada publiciranim studijama koje su uključivale istu populaciju bolesnika), za potvrdu ovdje predstavljenih rezultata naš je dugoročni cilj tijekom vremena skupiti još veći broj bolesnika. Dulji vremenski rok praćenja bolesnika također bi omogućio kliničko-patološku korelaciju kojom bi se razjasnili FTD slučajevi s visokim vrijednostima svih triju promatranih markera. Time bismo dobili odgovor radi li se ovdje o lažno pozitivnim nalazima, komorbiditetu AB i FTD ili AB koja je klinički nalikovala FTD.

## 7. ZAKLJUČCI

1. Za sva tri biomarkera (t-tau, p-tau181 i p-tau199) korištena u ovom istraživanju postoji statistički značajna razlika koncentracija između bolesnika s AB i FTD podudarnih dobnih skupina. Usprkos tome ni jedan od tri biomarkera nije zadovoljio kriterije „idealnog“ biomarkera za diferenciranje između AB i FTD skupina bolesnika. Među njima je p-tau199 postigao najbolji rezultat uz osjetljivost od 92,6% i specifičnost od 56,0% pri razlikovanju bolesnika s AB i FTD podudarnih dobnih skupina;
2. Za sva tri biomarkera (t-tau, p-tau181 i p-tau199) korištena u ovom istraživanju postoji statistički značajna razlika koncentracija između bolesnika s AB i ispitanika kontrolne skupine. Od tri biomarkera korištena u ovom istraživanju, statistički značajna razlika koncentracija između bolesnika s FTD i ispitanika kontrolne skupine postoji samo za p-tau181.
3. Međusobne kombinacije triju markera (npr. omjeri, zbrojevi, umnošci) u pravilu (uz jedan izuzetak) nisu pospješile razlikovanje bolesnika s AB i FTD podudarnih dobnih skupina u odnosu na rezultate najboljeg pojedinačnog markera (p-tau199);
4. U skupini bolesnika s AB i FTD postoji statistički značajna pozitivna korelacija između vrijednosti t-tau i p-tau181. Statistički značajne korelacije nisu nađene u odnosima ostalih markera unutar triju skupina. Od kliničkih kriterija, statistički značajna negativna korelacija postoji između broja MMSE bodova i vrijednosti p-tau199;
5. Nije nađena razlika u vrijednostima promatranih markera i kliničkih parametara između ženskih i muških ispitanika ni u jednoj ispitivanoj skupini;
6. Čimbenici koji su bili statistički značajno povezani s dijagnozom FTD bili su: koncentracije t-tau<500,0 pg/ml, p-tau181<63,45 pg/ml i p-tau199<30,30 pg/ml;

7. Najbolji model za točnu klasifikaciju bolesnika s FTD naspram bolesnika s AB uključivao je kombinaciju p-tau<sub>199</sub><30,30 pg/ml i t-tau<500,0 pg/ml. Tim modelom se točno dijagnosticiralo 88,0% (22 od 25) bolesnika s FTD;
8. U dijagnostičkoj obradi mlađih bolesnika sa sindromom demencije, tri biomarkera korištena u ovom istraživanju bi mogla imati važnu ulogu u razlikovanju bolesnika s AB i FTD, pogotovo ukoliko se uzmu u obzir njihove kombinacije s drugim potencijalnim pokazateljima bolesti (npr. A $\beta$ , proteini neurofilamenata, potencijalni novi markeri).



## 8. SAŽETAK

Alzheimerova bolest (AB) i frontotemporalna demencija (FTD) predstavljaju važan diferencijalno dijagnostički problem u svakodnevnoj kliničkoj praksi. Stoga postoji potreba pronalaska bioloških markera kojima bi se pospješila točnost postavljanja dijagnoze. Cilj je ove disertacije bio ocijeniti dijagnostičku važnost triju potencijalnih markera iz likvora: ukupnog tau proteina (t-tau), tau proteina fosforiliranog na treoninu 181 (p-tau181) i tau proteina fosforiliranog na serinu 199 (p-tau199) u diferencijalnoj dijagnozi bolesnika s AB i FTD podudarnih dobnih skupina. Koncentracije navedenih proteina iz likvora određene su u 25 bolesnika s FTD, 27 bolesnika s AB te 25 ispitanika kontrolne skupine. Vrijednosti t-tau, p-tau181 i p-tau199 iz likvora su bile značajno veće u skupini bolesnika s AB nego u skupini bolesnika s FTD ( $p < 0,001$ ) i kontrolnoj skupini ( $p < 0,001$ ), dok je statistički značajna razlika između bolesnika s FTD i ispitanika kontrolne skupine nađena samo za p-tau181 ( $p = 0,028$ ). Kad je osjetljivost postavljena na vrijednost 85% ili više, specifičnost pri razlikovanju bolesnika s AB i FTD iznosila je 40,0% za t-tau, 37,5% za p-tau181 i 56,0% za p-tau199, čime nijedan od ovih markera nije zadovoljio kriterije radne skupine za markere (osjetljivost i specifičnost  $> 85\%$ ). Ipak, upotrebom kombinacije vrijednosti koncentracija t-tau i p-tau199 markera iz likvora postignuta je točna klasifikacija 22 od 25 bolesnika s FTD. Zaključeno je da nijedan od navedenih markera zasebno nije pokazao karakteristike „idealnog“ markera, ali je kombinacija t-tau i p-tau199 detektirala zadovoljavajuće visoki postotak FTD bolesnika (88%).

## 9. SUMMARY

CSF total tau and phosphorylated tau proteins in the differential diagnosis of dementia

Author: Marina Boban (2009.)

Alzheimer's disease (AD) and frontotemporal dementia (FTD) represent an important differential diagnostic problem in clinical practice. The identification for new biomarkers that would help establishing the diagnosis and primary cause of the dementia is therefore of great relevance. The aim of this study was to investigate the diagnostic accuracy of three potential CSF biomarkers, total tau protein (t-tau), tau protein phosphorylated at threonine 181 (p-tau181) and tau protein phosphorylated at serine 199 (p-tau199) in the differential diagnosis of AD and FTD patients in relatively young age groups. The concentrations of these three CSF biomarkers were measured in 25 FTD patients, 27 AD patients and 25 control subjects. The CSF concentrations of all three markers were significantly higher in AD than in FTD patients ( $p < 0.001$ ) or control subjects ( $p < 0.001$ ). No difference was observed in FTD patient group compared to controls, except for p-tau181 ( $p = 0.028$ ). When sensitivity was set at 85% or higher, specificity in differentiation between FTD and AD patients reached 40,0% for t-tau, 37,5% for p-tau181 and 56,0% for p-tau199. Improvement of the diagnostic accuracy upon logistic regression analysis with t-tau and p-tau199 as independent variables showed that 22 out of 25 FTD patients could be correctly classified. In conclusion, none of the markers *per se* fulfilled the criteria for the „ideal“ marker (sensitivity and specificity higher than 85%). However, combination of t-tau and p-tau199 detected correctly 88% of FTD patients, thus largely satisfying practical requirements.

## 10. LITERATURA

1. American Psychiatric Association. Diagnostic and statistical manual of mental disorders (IV-TR). 4. izd. Washington DC: American Psychiatric Publishing Inc; 2000.
2. Ferri CP, Prince M, Brayne C, i sur. Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *Lancet* 2005;366:2112-7.
3. Berr C, Wancata J, Ritchie K. Prevalence of dementia in the elderly in Europe. *Eur Neuropsychopharmacol* 2005;15:463-71.
4. Lobo A, Launer LJ, Fratiglioni L, i sur. Prevalence of dementia and major subtypes in Europe: A collaborative study of population-based cohorts. Neurologic Diseases in the Elderly Research Group. *Neurology* 2000;54:S4-9.
5. Blennow K, de Leon MJ, Zetterberg H. Alzheimer's disease. *Lancet* 2006;368:387-403.
6. Mayeux R. Epidemiology of neurodegeneration. *Annu Rev Neurosci* 2003;26:81-104.
7. Mortimer JA, Snowdon DA, Markesbery WR. Head circumference, education and risk of dementia: findings from the Nun Study. *J Clin Exp Neuropsychol* 2003;25:671-9.
8. Jellinger KA. Head injury and dementia. *Curr Opin Neurol* 2004;17:719-23.
9. Luchsinger JA, Mayeux R. Dietary factors and Alzheimer's disease. *Lancet Neurol* 2004;3:579-87.
10. Gatz M, Reynolds CA, Fratiglioni L, i sur. Role of genes and environments for explaining Alzheimer disease. *Arch Gen Psychiatry* 2006;63:168-74.
11. Harvey RJ, Skelton-Robinson M, Rossor MN. The prevalence and causes of dementia in people under the age of 65 years. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2003;74:1206-9.
12. Goate A, Chartier-Harlin MC, Mullan M, i sur. Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature* 1991;349:704-6.
13. Sherrington R, Rogaev EI, Liang Y, i sur. Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature* 1995;375:754-60.
14. Levy-Lahad E, Wasco W, Poorkaj P, i sur. Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. *Science* 1995;269:973-7.
15. Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, i sur. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* 1993;261:921-3.
16. Poirier J, Davignon J, Bouthillier D, Kogan S, Bertrand P, Gauthier S. Apolipoprotein E polymorphism and Alzheimer's disease. *Lancet* 1993;342:697-9.
17. Farrer LA, Cupples LA, Haines JL, i sur. Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease: a meta-analysis. *JAMA* 1997;278:1349-56.
18. Meyer MR, Tschanz JT, Norton MC, i sur. ApoE genotype predicts when-not whether-one is predisposed to develop Alzheimer's disease. *Nature Genetics* 1998;19:321-2.
19. Raber J, Huang Y, Ashford JW. ApoE genotype accounts for the vast majority of AD risk and AD pathology. *Neurobiol Aging* 2004;25:641-50.
20. Roth M. The association of clinical and neurological findings and its bearing on the classification and aetiology of Alzheimer's disease. *Br Med Bull* 1986;42:42-50.
21. Blennow K, Wallin A, Gottfries CG. Presence of parietal lobe symptomatology distinguishes early and late onset Alzheimer's disease. *Int J Geriatr Psychiat* 1991;6:147-54.
22. Wilcock GK, Esiri MM. Plaques, tangles and dementia. A quantitative study. *J Neurol Sci* 1982;56:343-56.

23. Hansen LA, DeTeresa R, Davies P, Terry RD. Neocortical morphometry, lesion counts, and choline acetyltransferase levels in the age spectrum of Alzheimer's disease. *Neurology* 1988;38:48–54.
24. Prohovnik I, Perl DP, Davis KL, Libow L, Lesser G, Haroutunian V. Dissociation of neuropathology from severity of dementia in late-onset Alzheimer disease. *Neurology* 2006;66:49–55.
25. Mann DM, Yates PO, Marcyniuk B. Alzheimer's presenile dementia, senile dementia of Alzheimer type and Down's syndrome in middle age form an age related continuum of pathological changes. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1984;10:185–207.
26. Brayne C, Calloway P. Normal ageing, impaired cognitive function, and senile dementia of the Alzheimer's type: a continuum? *Lancet* 1988;331:1265–7.
27. Davies L, Wolska B, Hilbich C, i sur. A4 amyloid protein deposition and the diagnosis of Alzheimer's disease: prevalence in aged brains determined by immunocytochemistry compared with conventional neuropathologic techniques. *Neurology* 1988;38:1688–93.
28. Petersen RC. Mild cognitive impairment as a diagnostic entity. *J Intern Med* 2004;256:183–94.
29. Gauthier S, Reisberg B, Zaudig M, i sur. Mild cognitive impairment. *Lancet* 2006;367:1262–70.
30. Markesbery WR, Schmitt FA, Kryscio RJ, Davis DG, Smith CD, Wekstein DR. Neuropathologic substrate of mild cognitive impairment. *Arch Neurol* 2006;63:38–46.
31. Visser PJ, Scheltens P, Verhey FR. Do MCI criteria in drug trials accurately identify subjects with predementia Alzheimer's disease? *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2005;76:1348–54.
32. Braak H, Braak E. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol* 1991;82:239–59.
33. McKhann G, Drachman D, Folstein M, Katzman R, Price D, Stadlan EM. 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* 1984;34:939–44.
34. World Health Organization. ICD-10: international statistical classification of diseases and related health problems. 10. izd. Geneva: World Health Organization; 2004.
35. Folstein MF, Folstein SE, McHugh PR. "Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J Psychiatr Res* 1975;12:189–98.
36. Knopman DS, DeKosky ST, Cummings JL, i sur. Practice parameter: diagnosis of dementia (an evidence-based review). Report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology* 2001;56:1143–53.
37. Neuropathology Group of the Medical Research Council Cognitive Function and Ageing Study. Pathological correlates of late-onset dementia in a multicentre, community-based population in England and Wales. *Lancet* 2001;357:169–75.
38. Lim A, Tsuang D, Kukull W, i sur. Clinico-neuropathological correlation of Alzheimer's disease in a community-based case series. *J Am Geriatr Soc* 1999;47:564–9.
39. Snowdon DA, Greiner LH, Mortimer JA, Riley KP, Greiner PA, Markesbery WR. Brain infarction and the clinical expression of Alzheimer disease: the Nun Study. *JAMA* 1997;277:813–7.
40. Blennow K, Hampel H. CSF markers for incipient Alzheimer's disease. *Lancet Neurol* 2003;2:605–13.
41. DeKosky ST, Marek K. Looking backward to move forward: early detection of neurodegenerative disorders. *Science* 2003;302:830–4.
42. Morris JC. Mild cognitive impairment is early-stage Alzheimer disease: time to revise diagnostic criteria. *Arch Neurol* 2006;63:15–6.

43. Lansbury PT Jr. Back to the future: the 'old-fashioned' way to new medications for neurodegeneration. *Nat Med* 2004;10Suppl:S51-7.
44. The Ronald and Nancy Reagan Research Institute of the Alzheimer's Association and the National Institute on Aging Working Group. Consensus report of the Working Group on: "Molecular and Biochemical Markers of Alzheimer's Disease". *Neurobiol Aging* 1998;19:109-16.
45. Hesse C, Rosengren L, Vanmechelen E, i sur. Cerebrospinal fluid markers for Alzheimer's disease evaluated after acute ischemic stroke. *J Alzheimer Dis* 2000;2:199-206.
46. Otto M, Wiltfang J, Tumani H, i sur. Elevated levels of tau-protein in cerebrospinal fluid of patients with Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurosci Lett* 1997;225:210-2.
47. Blennow K, Wallin A, Ågren H, Spenger C, Siegfried J, Vanmechelen E. Tau protein in cerebrospinal fluid: a biochemical diagnostic marker for axonal degeneration in Alzheimer's disease? *Mol Chem Neuropathol* 1995;26:231-45.
48. Welge V, Fiege O, Lewczuk P, i sur. Combined CSF tau, p-tau181 and amyloid-beta 38/40/42 for diagnosing Alzheimer's disease. *J Neural Transm* 2009;116:203-12.
49. Wolf H, Jelic V, Gertz HJ, Nordberg A, Julin P, Wahlund LO. A critical discussion of the role of neuroimaging in mild cognitive impairment. *Acta Neurol Scand* 2003;107:52-76.
50. Gottfries J, Blennow K, Lehmann MW, Regland B, Gottfries CG. Onecarbon metabolism and other biochemical correlates of cognitive impairment as visualized by principal component analysis. *J Geriatr Psychiatry Neurol* 2001;14:109-14.
51. Maruyama M, Arai H, Sugita M, i sur. Cerebrospinal fluid amyloid beta(1-42) levels in the mild cognitive impairment stage of Alzheimer's disease. *Exp Neurol* 2001;172:433-6.
52. Buerger K, Teipel SJ, Zinkowski R, i sur. CSF tau protein phosphorylated at threonine 231 correlates with cognitive decline in MCI subjects. *Neurology* 2002;59:627-9.
53. Okamura N, Arai H, Maruyama M, i sur. Combined Analysis of CSF Tau Levels and [(123)I]Iodoamphetamine SPECT in mild cognitive impairment: implications for a novel predictor of Alzheimer's disease. *Am J Psychiatry* 2002;159:474-6.
54. Andreasen N, Vanmechelen E, Vanderstichele H, Davidsson P, Blennow K. Cerebrospinal fluid levels of total-tau, phospho-tau and A-42 predicts development of Alzheimer's disease in patients with mild cognitive impairment. *Acta Neurol Scand* 2003;107:47-51.
55. Braak E, Griffing K, Arai K, Bohl J, Bratzke H, Braak H. Neuropathology of Alzheimer's disease: what is new since A. Alzheimer? *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 1999;249:14-22.
56. Seab JP, Jagust WS, Wong SFS, Roos MS, Reed BR, Budinger TF. Quantitative NMR measurements of hippocampal atrophy in Alzheimer's disease. *Magn Reson Med* 1988;8: 200-8.
57. Jagust W. Positron emission tomography and magnetic resonance imaging in the diagnosis and prediction of dementia. *Alzheimers Dementia* 2006;2:36-42.
58. Laakso MP, Partanen K, Riekkinen P, i sur. Hippocampal volumes in Alzheimer's disease, Parkinson's disease with and without dementia, and in vascular dementia: an MRI study. *Neurology* 1996;46:678-81.
59. Frisoni GB, Laakso MP, Beltramello A, i sur. Hippocampal and entorhinal cortex atrophy in frontotemporal dementia and Alzheimer's disease. *Neurology* 1999;52:91-100.
60. Jack CR Jr, Shiung MM, Weigand SD, i sur. Brain atrophy rates predict subsequent clinical conversion in normal elderly and amnesic MCI. *Neurology* 2005;65:1227-31.

61. van de Pol LA, Hensel A, Barkhof F, Gertz HJ, Scheltens P, van der Flier WM. Hippocampal atrophy in Alzheimer disease: age matters. *Neurology* 2006;66:236–8.
62. deToledo-Morrell L, Stoub TR, Bulgakova M, i sur. MRI-derived entorhinal volume is a good predictor of conversion from MCI to AD. *Neurobiol Aging* 2004;25:1197–203.
63. Pennanen C, Kivipelto M, Tuomainen S, i sur. Hippocampus and entorhinal cortex in mild cognitive impairment and early AD. *Neurobiol Aging* 2004;25:303–10.
64. Grinberg LT, Rub U, Feretti REL, i sur. The dorsal raphe nucleus shows phospho-tau neurofibrillary changes before the transentorhinal region in AD. A precocious onset? *Neuropathol Appl Neurobiol* (accepted for publication).
65. Herholz K, Salmon E, Perani D, i sur. Discrimination between Alzheimer dementia and controls by automated analysis of multicenter FDG PET. *Neuroimage* 2002;17:302–16.
66. Silverman DH, Small GW, Chang CY, i sur. Positron emission tomography in evaluation of dementia: Regional brain metabolism and long-term outcome. *JAMA* 2001;286:2120–7.
67. Minoshima S, Foster NL, Sima AA, Frey KA, Albin RL, Kuhl DE. Alzheimer's disease versus dementia with Lewy bodies: cerebral metabolic distinction with autopsy confirmation. *Ann Neurol* 2001;50:358–65.
68. Chetelat G, Desgranges B, de la Sayette V, Viader F, Eustache F, Baron JC. Mild cognitive impairment: Can FDG-PET predict who is to rapidly convert to Alzheimer's disease? *Neurology* 2003;60:1374–7.
69. de Leon MJ, Convit A, Wolf OT, i sur. Prediction of cognitive decline in normal elderly subjects with 2-[(18)F]fl uoro-2-deoxy-D-glucose/ positron-emission tomography (FDG/PET). *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:10966–71.
70. De Santi S, de Leon MJ, Rusinek H, i sur. Hippocampal formation glucose metabolism and volume losses in MCI and AD. *Neurobiol Aging* 2001;22:529–39.
71. Klunk WE, Engler H, Nordberg A, i sur. Imaging brain amyloid in Alzheimer's disease with Pittsburgh Compound-B. *Ann Neurol* 2004;55:306–19.
72. Koivunen J, Pirttilä T, Kemppainen N, i sur. PET amyloid ligand [11C]PIB uptake and cerebrospinal fluid beta-amyloid in mild cognitive impairment. *Dement Geriatr Cogn Disord* 2008;26:378-83.
73. Rabinovici GD, Furst AJ, O'Neil JP, i sur. 11C-PIB PET imaging in Alzheimer disease and frontotemporal lobar degeneration. *Neurology* 2007;68:205-12.
74. Small GW, Kepe V, Ercoli LM, i sur. PET of brain amyloid and tau in mild cognitive impairment. *N Engl J Med* 2006;355:2652-63.
75. Dubois B, Feldman HH, Jacova C, i sur. Research criteria for the diagnosis of Alzheimer's disease: revising the NINCDS-ADRDA criteria. *Lancet Neurol* 2007;6:734-46.
76. Davidsson P, Sjögren M. Proteome studies of CSF in AD patients. *Mech Ageing Dev* 2006;127:133-7.
77. Simonsen AH, McGuire J, Podust VN, i sur. Identification of a novel panel of cerebrospinal fluid biomarkers for Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 2008;29:961-8.
78. Zetterberg H, Rübtschi U, Portelius E, i sur. Clinical proteomics in neurodegenerative disorders. *Acta Neurol Scand* 2008;118:1-11.
79. Hampel H, Bürger K, Teipel SJ, Bokde AL, Zetterberg H, Blennow K. Core candidate neurochemical and imaging biomarkers of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 2008;4:38-48.
80. de Jong D, Kremer BP, Olde Rikkert MG, Verbeek MM. Current state and future directions of neurochemical biomarkers for Alzheimer's disease. *Clin Chem Lab Med* 2007;45:1421-34.

81. Braak H, Braak E. Evolution of neuronal changes in the course of Alzheimer's disease. *J Neural Transm Suppl* 1998;53:127-40.
82. Price JL, Morris JC. Tangles and plaques in nondemented aging and "preclinical" Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 1999;45:358-68.
83. Webber KM, Raina AK, Marlatt MW, i sur. The cell cycle in Alzheimer disease: a unique target for neuropharmacology. *Mech Ageing Dev* 2005;126:1019-25.
84. Aisen PS. The potential of anti-inflammatory drugs for the treatment of Alzheimer's disease. *Lancet Neurol* 2002;1:279-84.
85. Gibson GE, Huang HM. Oxidative stress in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 2005;26:575-8.
86. Reddy PH, Beal MF. Are mitochondria critical in the pathogenesis of Alzheimer's disease? *Brain Res Brain Res Rev* 2005;49:618-32.
87. Blessed G, Tomlinson BE, Roth M. The association between quantitative measures of dementia and of senile change in the cerebral grey matter of elderly subjects. *Br J Psychiatry* 1968;114:797-811.
88. Masters CL, Simms G, Weinman NA, Multhaup G, McDonald BL, Beyreuther K. Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985;82:4245-9.
89. Haass C, Schlossmacher MG, Hung AY, i sur. Amyloid beta-peptide is produced by cultured cells during normal metabolism. *Nature* 1992;359:322-5.
90. Kang J, Lemaire HG, Unterbeck A, i sur. The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature* 1987;325:733-6.
91. Hardy J, Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 2002;297:353-6.
92. Wolfe MS, Selkoe D. Two transmembrane aspartates in PS-1 required for endoproteolysis and gamma-secretase activity. *Nature* 1999;398:513-7.
93. Rovelet-Lecrux A, Hannequin D, Raux G, i sur. APP locus duplication causes autosomal dominant early-onset Alzheimer disease with cerebral amyloid angiopathy. *Nat Genet* 2006;38:24-6.
94. Jarrett JT, Berger EP, Lansbury PT Jr. The carboxy terminus of the beta amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Biochemistry* 1993;32:4693-7.
95. Walsh DM, Selkoe DJ. Deciphering the molecular basis of memory failure in Alzheimer's disease. *Neuron* 2004;44:181-93.
96. Lesné S, Koh MT, Kotilinek L, i sur. A specific amyloid-beta protein assembly in the brain impairs memory. *Nature* 2006;440:352-7.
97. Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Tung YC, Quinlan M, Wisniewski HM, Binder LI. Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein  $\tau$  (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc Natl Acad Sci* 1986;83:4913-7.
98. Nukina N, Ihara Y. One of the antigenic determinants of paired helical filaments is related to tau protein. *J Biochem (Tokyo)* 1986;99:1541-4.
99. Bierer LM, Hof PR, Purohit DP, i sur. Neocortical neurofibrillary tangles correlate with dementia severity in Alzheimer's disease. *Arch Neurol* 1995;52:81-8.
100. Johnson GV, Jenkins SM. Tau protein in normal and Alzheimer's disease brain. *J Alzheimers Dis* 1999;1:307-28.
101. Iqbal K, Alonso Adel C, Chen S, i sur. Tau pathology in Alzheimer disease and other tauopathies. *Biochim Biophys Acta* 2005;1739:198-210.
102. Johnson GV, Stoothoff WH. Tau phosphorylation in neuronal cell function and dysfunction. *J Cell Sci* 2004;117:5721-9.

103. Khatoon S, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. Brain levels of microtubule associated protein tau are elevated in Alzheimer's disease brain: a radioimmunoslot-blot assay for nanograms of the protein. *J Neurochem* 1992;59:750-3.
104. Iqbal K, Grundke-Iqbal I, Zaidi T, i sur. Defective brain microtubule assembly in Alzheimer's disease. *Lancet* 1986;2:421-6.
105. Iqbal K, Zaidi T, Bancher C, Grundke-Iqbal I. Alzheimer paired helical filaments: restoration of the biological activity by dephosphorylation. *FEBS Lett* 1994;349:104-8.
106. Wang JZ, Gong CX, Zaidi T, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. Dephosphorylation of Alzheimer paired helical filaments by protein phosphatase-2A-2B. *J Biol Chem* 1995;270:4854-60.
107. Köpke E, Tung YC, Shaikh S, Alonso AC, Iqbal K, Grundke-Iqbal I. Microtubule associated protein tau: abnormal phosphorylation of a non-paired helical filament pool in Alzheimer disease. *J Biol Chem* 1993;268:24374-84.
108. Alonso AC, Zaidi T, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. Role of abnormally phosphorylated tau in the breakdown of microtubules in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:5562-6.
109. Alonso AC, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. Alzheimer's disease hyperphosphorylated tau sequesters normal tau into tangles of filaments and disassembles microtubules. *Nat Med* 1996;2:783-7.
110. Alonso AD, Grundke-Iqbal I, Barra HS, Iqbal K. Abnormal phosphorylation of tau and the mechanism of Alzheimer neurofibrillary degeneration: sequestration of MAP1 and MAP2 and the disassembly of microtubules by the abnormal tau. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:298-303.
111. Sengupta A, Kabat J, Novak M, Wu Q, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. Phosphorylation of tau at both Thr 231 and Ser 262 is required for maximal inhibition of its binding to microtubules. *Arch Biochem Biophys* 1998;357:299-309.
112. Alonso Adel C, Mederlyova A, Novak M, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. Promotion of hyperphosphorylation by frontotemporal dementia tau mutations. *J Biol Chem* 2004;279:34873-81.
113. Braak E, Griffing K, Arai K, Bohl J, Bratzke H, Braak H. Neuropathology of Alzheimer's disease: what is new since A. Alzheimer? *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 1999;249:14-22.
114. Blennow K. Cerebrospinal fluid protein biomarkers for Alzheimer's disease. *Neuro Rx* 2004;1:213-25.
115. Blennow K, Vanmechelen E, Hampel H. CSF total tau, Abeta42 and phosphorylated tau protein as biomarkers for Alzheimer's disease. *Mol Neurobiol* 2001;24:87-97.
116. Sunderland T, Linker G, Mirza N, i sur. Decreased beta-amyloid1-42 and increased tau levels in cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer disease. *JAMA* 2003;289:2094-103.
117. Welge V, Fiege O, Lewczuk P, i sur. Combined CSF tau, p-tau181 and amyloid-beta 38/40/42 for diagnosing Alzheimer's disease. *J Neural Transm* 2009;116:203-12.
118. Hampel H, Buerger K, Zinkowski R, i sur. Measurement of phosphorylated tau epitopes in the differential diagnosis of Alzheimer disease: a comparative cerebrospinal fluid study. *Arch Gen Psychiatry* 2004;61:95-102.
119. Chong MS, Sahadevan S. Preclinical Alzheimer's disease: diagnosis and prediction of progression. *Lancet Neurol* 2005;4:576-9.
120. Hansson O, Zetterberg H, Buchhave P, Londos E, Blennow K, Minthon L. Association between CSF biomarkers and incipient Alzheimer's disease in patients with mild cognitive impairment: a follow-up study. *Lancet Neurol* 2006;5:228-34.
121. DeCarli C. Mild cognitive impairment: prevalence, prognosis, aetiology, and treatment. *Lancet Neurol* 2003;2:15-21.



122. Hutton M, Lendon CL, Rizzu P, i sur. Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17. *Nature* 1998;393:702-5.
123. Poorkaj P, Bird TD, Wijsman E, i sur. Tau is a candidate gene for chromosome 17 frontotemporal dementia. *Ann Neurol* 1998;43:815-25.
124. Spillantini MG, Murrell JR, Goedert M, Farlow MR, Klug A, Ghetti B. Mutation in the tau gene in familial multiple system tauopathy with presenile dementia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:7737-41.
125. Sergeant N, Delacourte A, Buee L. Tau protein as a differential biomarker of tauopathies. *Biochim Biophys Acta* 2005;1739:179-97.
126. Andreasen N, Blennow K, Sjödin C, Winblad B, Svärdsudd K. Prevalence and incidence of clinically diagnosed memory impairments in a geographically defined general population in Sweden. The Piteå Dementia Project. *Neuroepidemiology* 1999;18:144-55.
127. Tissot R, Constantinidis J, Richard J. Pick's disease. U: Bruyn VA, ur. *Handbook of Clinical Neurology*. Amsterdam: North-Holland Publishing Company;1985, str. 233–46 (vol 46).
128. Harvey RJ, Roques P, Fox NC, Rossor MN. Non-Alzheimer dementias in young-patients. *Br J Psychiatry* 1996;168:384-5.
129. Ratnavalli E, Brayne C, Dawson K, Hodges JR. The prevalence of frontotemporal dementia. *Neurology* 2002;58:1615-21.
130. Rosso SM, Donker Kaat L, Baks T, i sur. Frontotemporal dementia in The Netherlands: patient characteristics and prevalence estimates from a population-based study. *Brain* 2003;126:2016-22.
131. Stevens T, Livingston G, Kitchen G, Manela M, Walker Z, Katona C. Islington study of dementia subtypes in the community. *Br J Psychiatry* 2002;180:270-6.
132. Gislason T, Larsson L, Sjogren M, Skoog I. A population-based study on the prevalence of frontal lobe dementia in 85-year olds. *Proceedings of the Sixth International Conference on Alzheimer's Disease and Related Disorders*. Amsterdam; 1998.
133. Sjogren M, Wallin A. Pathophysiological aspects of frontotemporal dementia—emphasis on cytoskeleton proteins and autoimmunity. *Mech Ageing Dev* 2001;122:1923–35.
134. Brun A, Gustafson L. Clinical and pathological aspects of frontotemporal dementia. U: Miller BL, Cummings JL, ur. *The Human Frontal Lobes: Functions and Disorders*. 1. izd. New York: The Guilford Press; 1999, str. 349–69.
135. Kertesz A, McMonagle P, Blair M, Davidson W, Munoz DG. The evolution and pathology of frontotemporal dementia. *Brain* 2005;128:1996-2005.
136. Lebert F, Pasquier F, Petit H. Personality traits and frontal lobe dementia. *Int J Geriatr Psychiatry* 1995;10:1047–9.
137. Neary D, Snowden J. Fronto-temporal dementia: nosology, neuropsychology, and neuropathology. *Brain Cogn* 1996;31:176–87.
138. Gustafson L. Clinical picture of frontal lobe degeneration of non-Alzheimer type. *Dementia* 1999;4:143–8.
139. Miller BL, Darby A, Benson DF, Cummings JL, Miller MH. Aggressive, socially disruptive and antisocial behaviour associated with fronto-temporal dementia. *Br J Psychiatry* 1997;170:150–4.
140. Pasquier F, Lebert F, Lavenu I, Guillaume B. The clinical picture of frontotemporal dementia: diagnosis and follow-up. *Dement Geriatr Cogn Disord* 1999;10:10–14.
141. Levy ML, Miller BL, Cummings JL, Fairbanks LA, Craig A. Alzheimer disease and frontotemporal dementias. Behavioral distinctions. *Arch Neurol* 1996;53:687–90.

142. Miller BL, Darby AL, Swartz JR, Yener GG, Mena I. Dietary changes, compulsions and sexual behavior in frontotemporal degeneration. *Dementia* 1995;6:195–9.
143. Lowenberg K, Boyd DA, Salon DD. Case reports: occurrence of Pick's disease in early adult years. *Arch Neurol Psychiatr* 1939;41:1004–20.
144. Lhermitte F. Human autonomy and the frontal lobes. II. Patient behavior in complex and social situations. The “environmental dependency syndrome.” *Ann Neurol* 1986;19:335–43.
145. Snowden JS, Neary D. Progressive language dysfunction and lobar atrophy. *Dementia* 1993;4:226–31.
146. Mesulam MM. Primary progressive aphasia--differentiation from Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 1987;22:533-4.
147. Scheltens P, Ravid R, Kamphorst W. Pathologic findings in a case of primary progressive aphasia. *Neurology* 1994;44:279-82.
148. Kertesz A, Munoz DG. Primary progressive aphasia. *Clin Neurosci* 1997;4:95-102.
149. Caselli RJ, Jack CR Jr. Asymmetric cortical degeneration syndromes. A proposed clinical classification. *Arch Neurol* 1992;49:770-80.
150. Cappa SF, Perani D, Messa C, Miozzo A, Fazio F. Varieties of progressive non-fluent aphasia. *Ann N Y Acad Sci* 1996;777:243-8.
151. Mimura M, Oda T, Tsuchiya K, i sur. Corticobasal degeneration presenting with nonfluent primary progressive aphasia: a clinicopathological study. *J Neurol Sci* 2001;183:19-26.
152. Onofrij M, Fulgente T, Malatesta G, Locatelli T. Focal abnormalities of P3 ERPs unveiled in patients with cortical lesions and primary progressive aphasia by average reference recordings. *Brain Topogr* 1994;6:311-22.
153. Simić G, Mrzljak L, Fucić A, Winblad B, Lovrić H, Kostović I. Nucleus subputaminalis (Ayala): the still disregarded magnocellular component of the basal forebrain may be human specific and connected with the cortical speech area. *Neuroscience* 1999;89:73-89.
154. Boban M, Kostovic I, Simic G. Nucleus subputaminalis: neglected part of the basal nucleus of Meynert. *Brain* 2006;129:E42.
155. Kostovic I. Prenatal development of nucleus basalis complex and related fiber systems in man: a histochemical study. *Neuroscience* 1986;17:1047–77.
156. Kracun I, Rosner H. Early cytoarchitectonic development of the anlage of the basal nucleus of Meynert in the human fetus. *Int J Dev Neurosci* 1986;4:143–9.
157. Hodges JR, Patterson K, Oxbury S, Funnell E. Semantic dementia. Progressive fluent aphasia with temporal lobe atrophy. *Brain* 1992;115:1783-806.
158. Howard D, Patterson K, Wise R, i sur. The cortical localization of the lexicons. Positron emission tomography evidence. *Brain* 1992;115:1769-82.
159. Evans JJ, Heggs AJ, Antoun N, Hodges JR. Progressive prosopagnosia associated with selective right temporal lobe atrophy. A new syndrome? *Brain* 1995;118:1-13.
160. Neary D, Snowden JS, Gustafson L, i sur. Frontotemporal lobar degeneration: a consensus on clinical diagnostic criteria. *Neurology* 1998;51:1546-54.
161. Knopman DS, Boeve BF, Parisi JE, i sur. Antemortem diagnosis of frontotemporal lobar degeneration. *Ann Neurol* 2005;57:480–8.
162. Mackenzie IR, Feldman HH. Ubiquitin immunohistochemistry suggests classic motor neuron disease, motor neuron disease with dementia, and frontotemporal dementia of the motor neuron disease type represent a clinicopathologic spectrum. *Neuropathol Exp Neurol* 2005;64:730-9.
163. Shi J, Shaw CL, Du Plessis D, i sur. Histopathological changes underlying frontotemporal lobar degeneration with clinicopathological correlation. *Acta Neuropathol* 2005;110:501–12.

164. Josephs KA, Petersen RC, Knopman DS, i sur. Clinicopathologic analysis of frontotemporal and corticobasal degenerations and PSP. *Neurology* 2006;66:41–8.
165. Godbolt AK, Josephs KA, Revesz T, i sur.. Sporadic and familial dementia with ubiquitin-positive tau-negative inclusions: clinical features of one histopathological abnormality underlying frontotemporal lobar degeneration. *Arch Neurol* 2005;62:1097–101.
166. Roberson ED, Hesse JH, Rose KD, i sur. Frontotemporal dementia progresses to death faster than Alzheimer disease. *Neurology* 2005;65:719–25.
167. Baker M, Mackenzie IR, Pickering-Brown SM, i sur. Mutations in progranulin cause tau-negative frontotemporal dementia linked to chromosome 17. *Nature* 2006;442:916–9.
168. Cruts M, Gijselinck I, van der Zee J, i sur. Null mutations in progranulin cause ubiquitin-positive frontotemporal dementia linked to chromosome 17q21. *Nature* 2006;442:920–4.
169. Cairns NJ, Bigio EH, Mackenzie IR, i sur. Neuropathologic diagnostic and nosologic criteria for frontotemporal lobar degeneration: consensus of the Consortium for Frontotemporal Lobar Degeneration. *Acta Neuropathol* 2007;114:5–22.
170. Kwong LK, Uryu K, Trojanowski JQ, Lee VM. TDP-43 proteinopathies: neurodegenerative protein misfolding diseases without amyloidosis. *Neurosignals* 2008;16:41–51.
171. Forman MS, Farmer J, Johnson JK, i sur. Frontotemporal dementia: clinicopathological correlations. *Ann Neurol* 2006;59:952–62.
172. Davies RR, Hodges JR, Kril JJ, Patterson K, Halliday GM, Xuereb JH. The pathological basis of semantic dementia. *Brain* 2005;128:1984–95.
173. Kramer JH, Miller BR. Alzheimer's disease and its focal variants. *Semin Neurol* 2000;20:447–54.
174. Johnson JK, Head E, Kim R, Starr A, Cotman CW. Clinical and pathological evidence for a frontal variant of Alzheimer disease. *Arch Neurol* 1999;56:1233–9.
175. Graham A, Davies R, Xuereb J, i sur. Pathological proven frontotemporal dementia presenting with severe amnesia. *Brain* 2005;128:597–605.
176. Varma AR, Snowden JS, Lloyd JJ, i sur. Evaluation of the NINCDS-ADRDA criteria in the differentiation of Alzheimer's disease and frontotemporal dementia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1999;66:184–8.
177. Bozeat S, Gregory CA, Ralph MA, Hodges JR. Which neuropsychiatric and behavioural features distinguish frontal and temporal variants of frontotemporal dementia from Alzheimer's disease? *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2000;69:178–86.
178. Gregory CA, Serra-Mestres J, Hodges JR. Early diagnosis of the frontal variant of frontotemporal dementia: how sensitive are standard neuroimaging and neuropsychologic tests? *Neuropsychiatry Neuropsychol Behav Neurol* 1999;12:128–35.
179. McKhann GM, Albert MS, Grossman M, i sur. Clinical and pathological diagnosis of frontotemporal dementia: report of the Work Group on Frontotemporal Dementia and Pick's Disease. *Arch Neurol* 2001;58:1803–9.
180. Zhukareva V, Vogelsberg-Ragaglia V, Van Deerlin VM, i sur. Loss of brain tau defines novel sporadic and familial tauopathies with frontotemporal dementia. *Ann Neurol* 2001;49:165–75.
181. Zhukareva V, Sundarraj S, Mann D, i sur. Selective reduction of soluble tau proteins in sporadic and familial frontotemporal dementias: an international follow-up study. *Acta Neuropathol* 2003;105:469–76.
182. Sjögren M, Minthon L, Davidsson P, i sur. CSF levels of tau, beta-amyloid(1-42) and GAP-43 in frontotemporal dementia, other types of dementia and normal aging. *J Neural Transm* 2000;107:563–79.

183. Grossman M, Farmer J, Leight S, i sur. Cerebrospinal fluid profile in frontotemporal dementia and Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 2005;57:721-9.
184. Mecocci P, Cherubini A, Bregnocchi M, i sur. Tau protein in cerebrospinal fluid: a new diagnostic and prognostic marker in Alzheimer disease? *Alzheimer Dis Assoc Disord* 1998;12:211-4.
185. Riemenschneider M, Wagenpfeil S, Diehl J, i sur. Tau and Abeta42 protein in CSF of patients with frontotemporal degeneration. *Neurology* 2002;58:1622-8.
186. Green AJ, Harvey RJ, Thompson EJ, Rossor MN. Increased tau in the cerebrospinal fluid of patients with frontotemporal dementia and Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 1999;259:133-5.
187. Andersen C, Froelich Fabre S, Ostberg P, Lannfelt L, Wahlund L. Tau protein in cerebrospinal fluid from semantic dementia patients. *Neurosci Lett* 2000;294:155-8.
188. Arai H, Morikawa Y, Higuchi M, i sur. Cerebrospinal fluid tau levels in neurodegenerative diseases with distinct tau-related pathology. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;236:262-4.
189. Fabre SF, Forsell C, Viitanen M, i sur. Clinic-based cases with frontotemporal dementia show increased cerebrospinal fluid tau and high apolipoprotein E epsilon4 frequency, but no tau gene mutations. *Exp Neurol* 2001;168:413-8.
190. Rosso SM, van Herpen E, Pijnenburg YA, i sur. Total tau and phosphorylated tau 181 levels in the cerebrospinal fluid of patients with frontotemporal dementia due to P301L and G272V tau mutations. *Arch Neurol* 2003;60:1209-13.
191. Pijnenburg YA, Schoonenboom NS, Rosso SM, i sur. CSF tau and Abeta42 are not useful in the diagnosis of frontotemporal lobar degeneration. *Neurology* 2004;62:1649.
192. Schoonenboom NS, Pijnenburg YA, Mulder C, i sur. Amyloid  $\beta$  (1-42) and phosphorylated tau in CSF as markers for early-onset Alzheimer disease. *Neurology* 2004;62:1580-4.
193. Hampel H, Teipel SJ. Total and phosphorylated tau proteins: evaluation as core biomarker candidates in frontotemporal dementia. *Dement Geriatr Cogn Disord* 2004;17:350-4.
194. Itoh N, Arai H, Urakami K, i sur. Large-scale, multicenter study of cerebrospinal fluid tau protein phosphorylated at serine 199 for the antemortem diagnosis of Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 2001;50:150-6.
195. De Jong D, Jansen RW, Pijnenburg YA, i sur. CSF neurofilament proteins in the differential diagnosis of dementia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2007;78:936-8.
196. Schonknecht P, Pantel J, Werle E, i sur. Cerebrospinal fluid protein tau levels in the differential diagnosis of Alzheimer's disease *Fortschr Neurol Psychiatr* 2000;68:439-46.
197. De Vreese K, Blennow K, Andreasen N, i sur. Discrimination of dementia with Lewy bodies from Alzheimer's disease via determination of the phospho-tau concentration in cerebrospinal fluid. 18th International Conference of Alzheimer's Disease. Barcelona, Spain, October 23-26, 2002.
198. Pijnenburg YA, Janssen JC, Schoonenboom NS, i sur. CSF neurofilaments in frontotemporal dementia compared with early onset Alzheimer's disease and controls. *Dement Geriatr Cogn Disord* 2007;23:225-30.
199. Forman MS, Zhukareva V, Bergeron C, i sur. Signature tau neuropathology in gray and white matter of corticobasal degeneration. *Am J Pathol* 2002;160:2045-53.
200. Tumani H, Nau R, Felgenhauer K. Beta-trace protein in cerebrospinal fluid: a blood-CSF barrier-related evaluation in neurological diseases. *Ann Neurol* 1998;44:882-9.
201. Reiber H. CSF flow—its influence on CSF concentration of brain-derived and blood-derived proteins. U: Teelken A, Korf J, ur. *Neurochemistry*. New York: Plenum Press; 1997, str. 423-32.

202. Betz A, Goldstein G, Katzmann R. Blood–brain–cerebrospinal fluid barriers. U: Siegel G, Agranoff B, Albers R, Molinoff P, ur. Basic neurochemistry. New York: Raven Press; 1994, str. 681–99.
203. Tapiola T, Overmyer M, Lehtovirta M, i sur. The level of cerebrospinal fluid tau correlates with neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Neuroreport* 1997;8:3961-3.
204. Buée L, Bussiére T, Buée-Scherrer V, Delacourte A, Hof PR. Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Res Brain Res Rev* 2000;33:95-130.
205. Rosso SM, van Herpen E, Heutink P. Total tau is not increased in cerebrospinal fluid of frontotemporal dementia patients with P301L and G272V tau mutations. *Neurobiol Aging* 2002;23:S379.
206. Maeck L, Meller J, Otto M, Stiens G, Wiltfang J, Stoppe G. Aβ peptide 1-42, Tau protein and S-100B protein level in cerebrospinal fluid of three patients with primary progressive aphasia. *Neurosci Lett* 2002;333:33-6.
207. Hodges JR, Davies RR, Xuereb JH, i sur. Clinicopathological correlates in frontotemporal dementia. *Ann Neurol* 2004;56:399–406.
208. Knibb JA, Xuereb J, Patterson K, Hodges JR. Clinical and pathological characterization of progressive aphasia. *Ann Neurol* 2006;56:156–65.
209. Lipton AM, Cullum CM, Satumtira S, i sur. Contribution of asymmetric synapse loss to lateralizing clinical deficits in frontotemporal dementias. *Arch Neurol* 2001;58:1233–9.
210. Clark CM, Xie S, Chittams J, i sur. Cerebrospinal fluid tau and β-amyloid. How well do these biomarkers reflect autopsy-confirmed dementia diagnoses? *Arch Neurol* 2003;60:1696–702.
211. Bian H, Van Swieten JC, Leight S, i sur. CSF biomarkers in frontotemporal lobar degeneration with known pathology. *Neurology* 2008;70:1827-35.
212. Buerger K, Zinkowski R, Teipel SJ, i sur. Differential diagnosis of Alzheimer disease with cerebrospinal fluid levels of tau protein phosphorylated at threonine 231. *Arch Neurol* 2002;59:1267-72.
213. Buerger K, Zinkowski R, Teipel SJ, i sur. Differentiation of geriatric major depression from Alzheimer's disease with CSF tau protein phosphorylated at threonine 231. *Am J Psychiatry* 2003;160:376-9.
214. Augustinack JC, Schneider A, Mandelkow EM, Hyman BT. Specific tau phosphorylation sites correlate with severity of neuronal cytopathology in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 2002;103:26-35.
215. Kimura T, Ono T, Takamatsu J, i sur. Sequential changes of tau-site-specific phosphorylation during development of paired helical filaments. *Dementia* 1996;7:177-81.
216. Boban M, Grbić K, Mladinov M, i sur. Cerebrospinal fluid markers in differential diagnosis of Alzheimer's disease and vascular dementia. *Coll Antropol* 2008;32:31-6.
217. Delacourte A, Sergeant N, Wattez A, Gauvreau D, Robitaille Y. Vulnerable neuronal subsets in Alzheimer's and Pick's disease are distinguished by their tau isoform distribution and phosphorylation. *Ann Neurol* 1998;43:193-204.
218. Sergeant N, Wattez A, Delacourte A. Neurofibrillary degeneration in progressive supranuclear palsy and corticobasal degeneration: tau pathologies with exclusively "exon 10" isoforms. *J Neurochem* 1999;72:1243-9.
219. Matsuo ES, Shin RW, Billingsley ML, i sur. Biopsy-derived adult human brain tau is phosphorylated at many of the same sites as Alzheimer's disease paired helical filament tau. *Neuron* 1994;13:989-1002.

220. Blomberg M, Jensen M, Basun H, Lannfelt L, Wahlund LO. Cerebrospinal fluid tau levels increase with age in healthy individuals. *Dement Geriatr Cogn Disord* 2001;12:127-32.
221. Sjögren M, Vanderstichele H, Agren H, i sur. Tau and Abeta42 in cerebrospinal fluid from healthy adults 21-93 years of age: establishment of reference values. *Clin Chem* 2001;47:1776-81.
222. Galasko D, Hansen LA, Katzman R, i sur. Clinical-neuropathological correlations in Alzheimer's disease and related dementias. *Arch Neurol* 1994;51:888-95.

## 11. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 1977. godine u Zagrebu gdje sam završila XV. (prirodoslovno-matematičku) gimnaziju. Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu upisala sam 1995. godine, a završila 2001. godine s prosječnom ocjenom 4,7. U dva sam navrata dobitnica Sveučilišne stipendije. Krajem studija boravila sam na jednomjesečnim edukacijama u bolnicama „12 de Octubre“ u Madridu te Universitaetsklinikum „Eppendorf“ u Hamburgu. Jednogodišnji stručni staž odradila sam u Kliničkoj bolnici „Dubrava“ u Zagrebu.

Početkom 2002. godine izabrana sam za dekanovog novaka na Katedri za neurologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (mentor: prof. dr. sc. Vesna Brinar). U svibnju 2003. godine započela sam specijalistički staž iz neurologije za Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu tijekom kojeg sam u dva navrata boravila na edukacijama u inozemstvu: 2004. godine na šestotjednoj edukaciji u Neurologische Klinik und Poliklinik, Klinikum der Ludwig Maximilian Universität München - Großhadern u Münchenu, te od rujna 2006. na sedmomjesečnoj edukaciji u Dementia Research Centre, University College London, Institute of Neurology, Queen Square Hospital. 2005. godine dobitnica sam potpore Zaklade „Miroslav Čačković“ za znanstveno, nastavno i stručno usavršavanje. U srpnju 2007. godine položila sam specijalistički ispit.

Objavila sam veći broj stručnih i znanstvenih članaka u međunarodnim i domaćim časopisima od kojih je sedam radova indeksirano u Current Contentsu. Bila sam članica organizacijskih odbora, te aktivno sudjelovala na nekoliko domaćih i međunarodnih kongresa i konferencija. Od 2005. godine surađujem na znanstvenom projektu prof. dr. sc. Gorana Šimića „Fosforilacija tau proteina u razvitku i Alzheimerovoj bolesti“ koji se provodi na Hrvatskom institutu za istraživanje mozga.