

# Biomarkeri u dijagnostici Alzheimerove bolesti

---

Šoštar, Nikola

Master's thesis / Diplomski rad

2018

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:105:030629>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2023-09-28**



Repository / Repozitorij:

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



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU**

**MEDICINSKI FAKULTET**

**Nikola Šoštar**

**Biomarkeri u dijagnostici**

**Alzheimerove bolesti**

**DIPLOMSKI RAD**



**ZAGREB, 2018.**

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU**

**MEDICINSKI FAKULTET**

**Nikola Šoštar**

**Biomarkeri u dijagnostici**

**Alzheimerove bolesti**

**DIPLOMSKI RAD**

**ZAGREB, 2018.**

Ovaj diplomski rad izrađen je na Klinici za neurologiju KBC-a Zagreb pod vodstvom doc. dr. sc. Marine Boban i predan je na ocjenu u akademskoj godini 2017./2018.

## **Popis i objašnjenje kratica korištenih u radu**

AB - Alzheimerova bolest

APP - engl. *amyloid precursor protein*

BACE-1 - engl.  *$\beta$ -site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1*

CJD - engl. *Creutzfeldt-Jakob disease*

CNS - engl. *Central nervous system*

CRP - engl. *C-reactive protein*

CSL - cerebrospinalni likvor

CT - kompjutorizirana tomografija

EEG - elektroencefalogram

ELISA engl. *Enzyme-linked immunosorbent assay*

GSK-3 - engl. *Glycogen synthase kinase 3*

ICAM-1 - engl. *Intercellular adhesion molecule 1*

ICAM-3 - engl. *Intercellular adhesion molecule 3*

KMB - krvno moždana barijera

LBD - engl. *Lewy body dementia*

MCI - engl. *Mild cognitive impairment*,

MMSE - engl. *Mini mental state examination*

MOCA - engl. *Montreal cognitive assessment*

MR - magnetna rezonancija

NGRN - engl. *Neurogranin*

NK - engl. *Natural Killer cells*

NMDA-R - engl. *N-methyl-D-aspartate receptor*

PET - pozitronska emisijska tomografija

PKC - engl. *Protein kinase C*

PSEN-1 - engl. *preseniline 1*, presenilin 1

PSEN-2 - engl. *preseniline 2*, presenilin 2

SPECT - engl. *Single-photon emission computed tomography*

VCAM-1 - engl. *Vascular cell adhesion protein 1*

VILIP-1 - engl. *Visine like protein 1*

## Sadržaj

<b>1. Sažetak</b> .....	<b>1</b>
<b>2. Summary</b> .....	<b>2</b>
<b>3. Uvod</b> .....	<b>3</b>
<b>4. Alzheimerova bolest</b> .....	<b>4</b>
<b>5. Biokemijski biomarkeri u dijagnozi AB</b> .....	<b>8</b>
5.1.    Biokemijski biomarkeri u cerebrospinalnom likvoru.....	10
5.1.1.    A $\beta$ peptidi .....	12
5.1.2.    TAU .....	13
5.1.3.    Omjer A $\beta$ <sub>1-42</sub> / T-Tau.....	14
5.1.4.    Visine-like protein 1 (VILIP-1).....	14
5.1.5.    YKL-40 .....	15
5.1.6.    Neurogranin (NGRN).....	16
5.1.7.    Novi biomarkerski kandidati .....	17
5.1.7.1.    BACE-1 .....	17
5.1.7.2.    Omjer NGRN/BACE-1 .....	17
5.1.7.3.    A $\beta$ oligomeri .....	18
5.1.7.4.    A $\beta$ skraćene izoforme.....	19
5.1.7.5.    APP izoforme .....	19
5.2.    Biokemijski biomarkeri u plazmi i serumu .....	20
5.2.1.    A $\beta$ povezani proteini.....	20
5.2.2.    Enzimi povezani s tau patologijom .....	21
5.2.3.    Biomarkeri neuroinflamacije .....	22
5.2.4.    Ostali povezani markeri .....	22
5.3.    Ostali biokemijski biomarkeri .....	23
<b>6. Zaključak</b> .....	<b>25</b>
<b>7. Literatura</b> .....	<b>26</b>
<b>8. Životopis</b> .....	<b>37</b>
<b>9. Zahvale</b> .....	<b>38</b>

## 1. Sažetak

### *Biomarkeri u dijagnostici Alzheimerove bolesti*

Nikola Šoštar

Otkrivanje novih markera za postavljanje dijagnoze Alzheimerove bolesti (AB) od velike je važnosti radi mogućnosti rane dijagnoze bolesti te pronalaženja odgovarajućeg lijeka za sprečavanje napredovanja bolesti. Trenutno se dijagnoza AB postavlja u relativno kasnijim stadijima bolesti kada su manje mogućnosti preventivnog djelovanja na patogenetsku kaskadu bolesti. Dijagnoza AB se uglavnom postavlja na temelju kliničkih kriterija, no u zadnje vrijeme se sve više koriste i dodatni markeri koji pomažu u povećanju točnosti dijagnoze (npr. likvorski markeri, MR i PET markeri).

Poznata je činjenica da bolest započinje nekoliko desetljeća prije pojave prvih simptoma, što je glavni fokus za ranu dijagnozu AB. Ovaj rad raspravlja o biokemijskim markerima koji su trenutno u upotrebi, kao i o potencijalnim obećavajućim kandidatima. Otkriće specifičnih i osjetljivih biomarkera, osobito onih koji se uzimaju iz krvi, može se smatrati osnovom koja bi dovela do što ranijeg i točnijeg postavljanja dijagnoze AB.

Uvodni dio ovog preglednog rada sadrži glavne spoznaje o AB i metodama postavljanja dijagnoze i liječenja AB, dok drugi dio rada raspravlja o poznatim biokemijskim markerima iz cerebrospinalne tekućine i krvi koji su već u upotrebi ili imaju veliku perspektivu za budućnost dijagnostike, a trenutačno se koriste u znanstvenim istraživanjima. Treći dio rada iznosi zaključak i raspravlja o budućim perspektivama u dijagnostici bolesti koje bi mogle dovesti do napretka u liječenju AB.

**Ključne riječi: Alzheimerova bolest, demencija, dijagnostika, biomarkeri, cerebrospinalna tekućina, krv**

## 2. Summary

### *Biomarkers in diagnosis of Alzheimer's disease*

Nikola Šoštar

Discovery of new markers for diagnosis of Alzheimer's disease (AD) is of great importance in terms of early diagnosis of the disease and possibly finding an appropriate cure for the disease. Currently, diagnosis of AD is confirmed only in the latter stages of the disease when possibilities of preventive strategies that may slow down progression of the disease are minimal. AD is mostly diagnosed by clinical criteria, but in recent years ancillary markers are increasingly used to improve sensitivity and specificity of diagnosis (e.g. cerebrospinal fluid markers, MRI and PET markers).

It is well known that the pathological process begins more than a decade before first symptoms onset, which is the main focus of early diagnosis of AD. This paper discusses biochemical markers that are currently in everyday clinical use as well as potential promising candidates. Thereby, discovery of specific and sensitive markers, especially the ones found in the blood, could be regarded as a breakthrough in earlier and more accurate diagnosis of AD.

Introductory part of this paper contains main facts about AD, diagnostic and management protocols in AD, while second part discusses currently known biochemical markers (from cerebrospinal fluid and blood) that are either already in use or have great perspective in the future of diagnostics and are currently used in research purposes. In third part of this paper, conclusion is given with future perspectives of biological markers in diagnosis of AD.

**Key words: Alzheimer's disease, biomarkers, dementia, diagnosis, cerebrospinal fluid, blood**



### 3. Uvod

Iskorijenjenjem većine teških infektivnih bolesti i sve kvalitetnijim liječenjem kroničnih bolesti, ljudski životni vijek se značajno produljio. Starenjem stanovništva, broj oboljelih od demencija će kroz dogledno vrijeme premašiti broj oboljelih od kardiovaskularnih bolesti koje su trenutno, kako u svijetu tako i u Republici Hrvatskoj, najčešći uzrok mortaliteta u starijoj životnoj dobi [1, 2].

Incidencija Alzheimerove bolesti (AB), jedne od najčešćih uzroka demencije, značajno raste, pogotovo među starijom populacijom, osobito osobama starijima od 80 godina kada su šanse za razvoj bolesti oko 50% [2]. Alzheimerova bolest je sporoprogresivna bolest, trenutno se dijagnoza postavlja većinom klinički i u relativno uznapredovalim fazama bolesti. Znajući da se promjene u mozgu oboljelih od AB počinju zbivati i desetljećima prije pojave prvih simptoma, smatra se da bi se ranim prepoznavanjem oboljelih i početkom liječenja već u asimptomatskoj fazi bolesti mogla prevenirati progresija i značajnije oštećenje mozga te razvoj bolesti. Za tako nešto bi bolest trebalo dijagnosticirati u asimptomatskoj fazi kada još nije došlo do značajnog oštećenja mozga. Otkrivanjem biokemijskih markera u cerebrospinalnoj tekućini i krvi, ali i drugih potencijalnih biomarkera, mogli bi se ovi ciljevi i ostvariti.

Cilj ovog preglednog rada je prikazati dosadašnje spoznaje i mogućnosti novih biokemijskih markera koji bi se mogli koristiti u ranoj dijagnozi Alzheimerove bolesti ili u diferencijalnoj dijagnozi Alzheimerove bolesti prema drugim demencijama.

#### 4. Alzheimerova bolest

Alzheimerova bolest je neurodegenerativna bolest čije je glavne patološke značajke prvi put u svoje bolesnice opisao Alois Alzheimer 1906. godine, dok naziv bolesti daje Emil Kraepelin 1910. godine. AB danas smatramo najčešćim uzrokom svih demencija, a isto tako je uočen i nagli porast oboljelih zadnjih desetljeća pa se tako smatra da je AB danas na petom mjestu uzroka smrti u svijetu [2].

S obzirom na to da suvremena medicina svakim novim otkrićem produljuje životni vijek čovjeka, smatra se da će u dogledno vrijeme AB postati jedan od najčešćih uzroka smrti. AB je prvenstveno bolest starije životne dobi. Incidencija bolesti raste sa životnom dobi te se smatra da u dobi iznad 80. godine incidencija iznosi 50%. Prosječno trajanje života od pojave prvih simptoma bolesti do smrti iznosi 10 do 20 godina [3]. Zbog svega navedenoga, Alzheimerova bolest je veliki socioekonomski i javnozdravstveni problem u svijetu kojim su pogođeni oboljeli, ali i njihove obitelji i društvo općenito budući da je oboljelima od AB u kasnijim stadijima bolesti nužno pružiti intenzivnu skrb i kontinuirani nadzor [4].

Uzrok nastanka AB je još uvijek nepoznat. Poznati su određeni rizični čimbenici, među kojima dominiraju prvenstveno okolišni, a manje i genetski rizični čimbenici. Nasljedni (familijarni) oblici AB su izuzetno rijetki (<0,5% slučajeva) i zajednički im je autosomno dominantni oblik nasljeđivanja s početkom bolesti u mlađoj životnoj dobi (prije 65. godine života). Tri su gena povezana uz nasljedni oblik bolesti: *amiloid prekursor protein (APP)* gen na kromosomu 21, zatim *presenilin-1 (PSEN-1)* gen na kromosomu 14 i *presenilin-2 (PSEN-2)* gen na kromosomu 1 koji imaju gotovo potpunu penetrantnost za pojavu bolesti te su povezane uz povećanu produkciju amiloid- $\beta$  (A $\beta$ ) proteina [3]. Nadalje, polimorfizam *APOE* gena pokazuju snažnu povezanost za pojavu AB u kasnijoj životnoj dobi, naročito inačica *APOE  $\epsilon$ 4*. *ApoE*, kojeg u središnjem živčanom sustavu prvenstveno sintetiziraju astrociti, zaslužan je za prijenos kolesterola

neuronima putem *ApoE* receptora. U slučaju poremećaja sinteze *ApoE*, dolazi do nakupljanja kolesterola te time i do indukcije  $\beta$ -sekretaznog puta i akumulacije  $A\beta_{42}$ . *APOE*  $\epsilon 4$  alel predstavlja genetski rizični faktor koji povećava rizik za razvoj AB, no nije nužno povezan uz pojavnost AB [58]. Osim toga, kod osoba s Downovim sindromom zbog trisomije 21. kromosoma gotovo uvijek dolazi do razvoja AB ukoliko dožive dob od 50 godina života. S druge strane, mutacija na *APP* genu (tzv. "Islandski" alel A673T) je protektivni genetski čimbenik za razvoj AB. Depresija u kasnoj životnoj dobi, kardiovaskularne bolesti, šećerna bolest neovisna o inzulinu, traume glave i moždani udari samo su neki od mogućih okolišnih rizičnih čimbenika za razvoj AB [3].

Dvije se specifične neuropatološke značajke nakupljaju u mozgu oboljelih od AB: amiloidni plakovi smješteni ekstracelularno te intracelularni neurofibrilarni snopići. Amiloidni plakovi su većinom sastavljeni od  $A\beta$  peptida građenih od 40 odnosno 42 aminokiseline ( $A\beta_{40}$  i  $A\beta_{42}$ ), dok su neurofibrilarni snopići sastavljeni od sparenih helikalnih filamenata hiperfosforiliranog tau proteina. Poznato je da se ove patološke značajke bolesti počinju nakupljati već desetljećima prije pojave prvih kliničkih znakova bolesti. Stoga se zadnjih godina intenzivno radi na pronalasku bioloških markera kojima bi se u što ranijem stadiju bolest mogla dijagnosticirati AB. Samim time, omogućilo bi se i otkrivanje novih lijekova koji bi mogli djelovati na sprečavanje daljnje progresije bolesti.

Kao početni simptom, u 90% svih oboljelih od AB se javlja progresivno pogoršanje kratkoročnog, tzv. epizodičkog pamćenja. Kasnijom progresijom bolesti pogoršava se i dugotrajno pamćenje [3]. Osim smetnji pamćenja kod bolesnika s AB razvijaju se oštećenja i drugih kognitivnih funkcija: govora, čitanja, pisanja, apstraktnog mišljenja, egzekutivnih funkcija, orijentiranosti [2]. Često se javljaju i simptomi depresije, anksioznosti, a ponekad u kasnijim fazama bolesti i razvoj psihotičnih simptoma [3].

U pregledu oboljelog s AB nalazimo ispade kognitivnog statusa, dok ostatak neurološkog statusa u ranim stadijima bolesti nije upadljiv. Daljnjom progresijom bolesti mogu se javiti ekstrapiramidalni simptomi poput bradikinezije, rigiditeta, poremećaji hoda i držanja. Diferencijalno dijagnostički je važno napomenuti da za razliku od nekih drugih demencija u AB nema poremećaja stanja svijesti, motorike, osjeta, funkcije perifernih i kranijskih živaca, cerebelarnih funkcija [5]. Zbog svega navedenoga, heteroanamneza ima gotovo najveću vrijednost pri dijagnozi AB. Najpouzdaniji podaci o početku prvih simptoma saznaju se od rodbine i drugih ljudi bliskih oboljelome. Obično obitelj navodi da oboljeli ima smetnje kratkoročnog pamćenja, loše je orijentirana (prvenstveno vremenski) te ima probleme s obavljanjem svakodnevnih životnih aktivnosti koje je do tada uredno obavljala.

Daljnjom dijagnostičkom obradom, diferencijalno dijagnostički se sužava niz uzroka demenciji. Inicijalno se rade neurokognitivni strukturirani pregledi poput *Mini Mental State Examination* (MMSE) i *Montreal Cognitive Assessment* (MOCA), koji iako nisu specifični daju dobar uvid u kognitivno stanje i omogućavaju praćenje progresije bolesti i odgovora na terapiju. Rutinske pretrage poput kompletne krvne slike, urina ili osnovni pregled cerebrospinalne tekućine su nespecifični za dijagnozu kao i elektroencefalografija (EEG). Rutinske slikovne pretrage kao što su kompjutorizirana tomografija (CT) i magnetna rezonancija (MR) mozga u inicijalnoj obradi oboljelog s AB mogu pomoći pri isključenju drugih patologija koje mogu dovesti do progresivnih kognitivnih oštećenja, dok MR mozga već u ranoj fazi bolesti može ukazivati na postojanje hipokampalne skleroze koja se može detektirati kod oboljelih od AB u inicijalnoj fazi bolesti. Pri već uznapredovaloj bolesti je vidljiva značajna kortikalna i subkortikalna atrofija mozga tj. smanjenje volumena i izravnanje girusa kore mozga [5].

Danas se u svakodnevnom kliničkom radu koriste dodatne dijagnostičke mogućnosti s ciljem povećanja točnosti postavljanja dijagnoze AB. Funkcionalne

slikovne metode poput pozitronske emisijske tomografije (PET) mozga omogućavaju *in vivo* vizualizaciju nakupljanja A $\beta$  u mozgu oboljelih od AB [3], dok upotreba i nekih drugih obilježivača nam pomaže u diferencijalnoj dijagnostici sindroma demencije. Također se ispitivanje cerebrospinalne tekućine na proteine A $\beta$ 42, ukupni i fosforilirani tau protein pokazalo iznimno važnim za ranu i točnu dijagnozu AB te diferencijalnu dijagnozu prema drugim demencijama [3]. Aktualno su značajna istraživanja i s ciljem otkrivanja biomarkera iz krvi koji bi što ranije mogli omogućiti dijagnosticiranje bolesti kako bi se što prije započela terapija [6].

Trenutno su terapijske mogućnosti u liječenju i sprečavanju progresije AB podosta oskudne. U uporabi su antagonist *N-metil-D-aspartat receptora* (NMDA-R), *memantin*, te inhibitori kolinesteraze *donezapil*, *galantamin* i *rivastigmin*. Ostala terapija je u potpunosti simptomatska. U slučaju pojave depresivnih, anksioznih ili psihotičnih simptoma često je nužno i psihijatrijsko liječenje i uporaba antidepressiva, antipsihotika ili anksiolitika ovisno o simptomima [3]. Najveći problem predstavlja kasna dijagnoza AB kao i terapija koja ne usporava tijek bolesti. Značajni teret je i na obitelji budući da te oboljeli zahtjevaju kontinuiranu intenzivnu skrb i nadzor. Iscrpna su istraživanja s ciljem pronalaženja novog „idealnog“ lijeka za modificiranje tijeka bolesti djelovanjem na patološku kaskadu u AB [7, 8].

## 5. Biokemijski biomarkeri u dijagnozi AB

Biološkim markerom nazivamo objektivno mjerilo biološkog ili patološkog procesa koje se može koristiti za procjenu rizika od razvoja neke bolesti, kao rani i točni dijagnostički pokazatelj ili za procjenu djelovanja terapije [9]. Trenutno se u rutinskom radu s oboljelima od AB koriste neki od biomarkera, prvenstveno biološki markeri iz cerebrospinalne tekućine, kao i neuroradiološki i PET biomarkeri. Osjetljivost, specifičnost i lakoća upotrebe te dostupnost su najvažniji faktori koji utječu na dijagnostičko korištenje markera u kliničkom radu [10-12].

S obzirom na činjenicu da se patološke promjene u AB javljaju desetljećima ranije u odnosu na pojavu prvih simptoma bolesti, intenzivno su istraživani markeri patološkog procesa koji bi već u pretkliničkim fazama mogli ukazati na osobu pod rizikom za razvoja AB. Donedavno su novootkriveni markeri bili u uporabi samo u kliničkim studijama, no danas postaju sve dostupniji u svakodnevnom radu s oboljelima od AB. Također, biomarkeri su i dalje neizostavni u kliničkim studijama gdje služe pri odabiru pacijenata za uključivanje u studije povezane s liječenjem AB. Svaki od biomarkera zasebno pruža djelomičnu informaciju te se pokazalo da kombinacija različitih biomarkera koji ukazuju na patološke promjene A $\beta$  i tau proteina pokazuju veću specifičnost i osjetljivost za postavljanje dijagnoze AB. Nadalje, proširenje uporabe biomarkera bi omogućila raniju dijagnozu AB, a samim time i raniji početak liječenja budućom modificirajućom terapijom. Također, biomarkeri bi mogli omogućiti bolji *staging* bolesti. Korištenjem biomarkera u kliničkim istraživanjima i u svakodnevnoj praksi ostvarila bi se kvalitetnija komunikacija na relaciji istraživanja i kliničke primjene, što bi naročito moglo doprinijeti razvoju lijekova za liječenje AB [10-14].

Trenutno dostupni biomarkeri imaju ograničene mogućnosti za predikciju kliničkog tijeka bolesti i nisu dostupni u svim centrima. Također, za rutinsku kliničku primjenu, potrebni su jednostavniji, lakše dostupni tj. neinvazivni te jeftiniji biomarkeri [15-21].

Trebaju se slijediti određeni kriteriji kako bi se razvili što kvalitetniji biomarkeri za dijagnozu demencija koji bi kasnije ušli u rutinsku kliničku praksu [22]:

- odražavanje fiziološkog procesa starenja
- odražavanje osnovnih patofizioloških zbivanja mozga
- reagiranje na farmakološke intervencije
- pokazivanje visoke osjetljivosti
- pokazivanje visoke specifičnosti za bolest u odnosu na srodne poremećaje
- omogućeno kontinuirano ponovljeno mjerenje
- omogućeno korištenje u laboratorijima diljem svijeta
- mjerenje neinvazivnim i lako izvodivim postupcima
- ne smije se štetiti osobi kojoj se određuje
- testiranje bi trebalo biti jeftino i brzo
- uzorci bi trebali biti "stabilni" kako bi se omogućio jednostavan i jeftin transport
- jednostavno prikupljanje uzoraka u izvanbolničkim uvjetima
- promjene bi trebale biti barem dvostruke u odnosu na normalne vrijednosti kako bi bilo omogućeno razlikovanje od kontrolnog uzorka
- definiranje dobrih graničnih vrijednosti za razlikovanje bolesti
- podaci moraju biti objavljeni u recenziranim časopisima ("peer to peer" reviewed)
- podaci moraju biti reproducirani od strane barem dva nezavisna istraživača

Jedan od izazova koji se javlja pri istraživanju novih biomarkera je preklapanje znatnog broja patologija u mozgu, poput cerebrovaskularnih bolesti koje se prema nekim istraživanjima javljaju u 40% pacijenata s AB, te demencija s Lewyjevim tjelešcima. Također, gotovo sve osobe s teškim cerebrovaskularnim oštećenjima pokazuju značajnu A $\beta$  patologiju, naročito oni stariji od 80 godina života. Kako bi se omogućilo razlikovanje između različitih vrsta demencija, potrebno je razumjeti kako kombinacije patoloških promjena utječu na promjene

u biomarkerima [4]. Nadalje, smatra se da će lijekovi koji bi se potencijalno mogli koristiti u modificiranju tijeka AB, zahtijevati sigurnu dijagnozu AB u pretkliničkom ili čak asimptomatskom stadiju bolesti (prije značajnije neurodegeneracije), što se može postići jedino postojanjem kvalitetnih i pouzdanih biomarkera [28].

U nastavku, opisani su biokemijski biomarkeri koji se trenutno rutinski koriste u dijagnozi AB, te potencijalni novi biomarkeri koji su još u fazi kliničkih istraživanja.

### **5.1. Biokemijski biomarkeri u cerebrospinalnom likvoru**

Budući da je cerebrospinalna tekućina, tj. likvor u izravnom kontaktu s ekstracelularnim prostorom mozga, dobar je izvor i pokazatelj biokemijskih promjena koje se javljaju u AB. Unatoč podijeljenosti oko invazivnosti lumbalne punkcije (zahvat kojim se prikuplja cerebrospinalna tekućina), trenutno su biomarkeri dobiveni iz cerebrospinalne tekućine optimalan izvor za dijagnozu AB za razliku od drugih izvora [23].

Biomarkeri iz cerebrospinalne tekućine se mogu ugrubo podijeliti na opće i specifične:

1. Opći biomarkeri su korisni pri sužavanju diferencijalne dijagnoze kod osoba sa sumnjom na demenciju. Uključuju testove za provjeru stanja krvno-moždane barijere (KMB) te pokazatelje upale. Omjer količine albumina u cerebrospinalnoj tekućini naspram količine u serumu je pokazatelj očuvanosti KMB. Naime, u slučaju da je omjer povećan, to označava propusnost KMB što nije slučaj u AB, gdje je KMB očuvana. Ovakav pokazatelj bi nas uputio na druge etiologije demencije poput infekcija, upalnih procesa, tumora ili vaskularne demencije. Nadalje, u bolestima poput multiple skleroze ili neuroborelioze pronalaze se protutijela stvorena procesom intratekalne proizvodnje imunoglobulina, što u AB ne nalazimo [23-33].



2. Specifični biomarkeri u pravilu pokazuju specifičnu podležeću molekularnu patologiju bolesti. U slučaju AB, većina biomarkera se bazira na odražavanju amiloidne i neurofibrilarne patologije te aksonalne degeneracije. To se postiglo uspoređivanjem i koreliranjem rezultata nalaza likvora oboljele osobe uzete tijekom života u odnosu na posmrtno nađenim neuropatološkim promjenama na obdukciji [23-33].

Senzitivnost ili osjetljivost biomarkera je pojam koji označava kapacitet biomarkera da identificira oboljele od neke bolesti, dok specifičnost označava kapacitet biomarkera da identificira zdrave pojedince. Važno je poznavati i pozitivnu prediktivnu vrijednost i negativnu prediktivnu vrijednost pojedinog biomarkera koje označavaju postotak osoba s pozitivnim odnosno negativnim testom koji su oboljeli, tj. nisu oboljeli od neke bolesti. Prema kriterijima *Ronald and Nancy Reagan Research Institute - National Institute of Aging working group* idealan dijagnostički biomarker za AB bi trebao pokazivati specifičnost i senzitivnost >80% te pozitivnu prediktivnu vrijednost  $\geq 80\%$  [23-33].

Mnogobrojna istraživanja su pokazala da oboljeli od AB u nalazima likvora pokazuju povišene razine ukupnog tau (*total tau* tj. t-tau) i fosforiliranog tau (p-tau) proteina te smanjene razine  $\beta$ -amiloida (1-42) ( $A\beta_{1-42}$ ) [23-33]. Korištenjem navedenih biomarkera u kombinaciji postiže se senzitivnost >95% i specifičnost >75% za dijagnozu AB [25]. Važno je napomenuti da se promjene u razinama tih biomarkera mogu uočiti već i u prodormalnoj fazi AB, dok se u asimptomatskoj fazi bolesti javljaju samo smanjene razine  $A\beta_{1-42}$  te su razine i p-tau i t-tau normalne i nepromijenjene [27, 29].

### 5.1.1. A $\beta$ peptidi

U AB, cijepanjem transmembranskog tipa 1 APP proteina putem specifičnih sekretaza (sekretaza  $\beta$  i  $\gamma$  koje se nalaze u sinaptičkim vezikulama) nastaju peptidi s 42 aminokiseline koji se pod određenim uvjetima agregiraju te stvaraju ekstracelularne (senilne) plakove [34]. U pacijenata oboljelih od AB je uočena značajna redukcija amiloidnih proteina u likvoru. Smanjene koncentracije A $\beta$ <sub>42</sub> su odraz sekvestracije senilnih plakova što je dokazano usporedbom s obduciranim mozgom i PET nakupljanjem amiloida u određenim regijama mozga [35, 36].

Do navedenoga dolazi zbog smanjenog uklanjanja A $\beta$  iz mozga putem cerebrospinalne tekućine u krv što dovodi do povećane agregacije i depozicije plakova. Ovisno o bolesti, A $\beta$  peptidi se razlikuju po specifičnosti. Frontotemporalna lobarna degeneracija je povezana s povećanom razinom A $\beta$ <sub>1-38</sub>, Lewy body demencija A $\beta$ <sub>1-37</sub>, dok se u AB pronalaze povećane razine A $\beta$ <sub>1-40</sub> i A $\beta$ <sub>1-42</sub> u likvoru. Iz tog razloga se češće koristi omjer A $\beta$ <sub>42</sub>/ A $\beta$ <sub>40</sub>, čime se točnost dijagnoze AB povećava. Nadalje, A $\beta$ <sub>42</sub> ima podjednaku dijagnostičku točnost kao i omjer A $\beta$ <sub>42</sub>/ A $\beta$ <sub>40</sub> za razlikovanje pacijenata oboljelih od AB u odnosu na zdrave i oboljele od nekih drugih oblika demencija. Vrijednosti A $\beta$ <sub>42</sub> oko 550 ng/L se uzimaju kao granične vrijednosti za dijagnozu AB, pri čemu koncentracija ispod 550 ng/l govori u prilog AB [37, 38].

Nakupljanje A $\beta$  je najizraženije u cerebralnom korteksu te hipokampusu u ranijim stadijima bolesti. To naročito vrijedi za A $\beta$ <sub>42</sub> koji je hidrofobniji i fibrilarniji čime oštećuje sinapse te dovodi do neurodegeneracije. Definitivna dijagnoza AB se može sa sigurnošću postaviti jedino *post mortem* što je za oboljelog prekasno. Međutim, uzimanjem detaljne anamneze ili heteroanamneze koje opisuju razvoj same bolesti te neurološki pregled pokazuju specifičnost i osjetljivost veću od 80% za razlikovanje AB u odnosu na druge bolesti. Slikovne metode poput MR ili PET-a mozga mogu poslužiti u sužavanju diferencijalne dijagnoze isto kao i laboratorijski nalazi [4]. Valja napomenuti da je zasebno izmjeren A $\beta$ <sub>42</sub> specifičniji

za prijelaz MCI (eng. Mild cognitive Impairment, blagi kognitivni poremećaj, mogući predstadij AB) u AB od ukupnog tau ili fosforiliranog tau proteina ili kombinacije sva tri biomarkera [39].

### 5.1.2. TAU

Tau protein je sastavni dio intracelularnih neurofibrilarnih tračaka sastavljenih od uparenih helikalnih filamentoznih polimera fosforiliranog tau proteina. U normalnim uvjetima tau protein je sastavni dio aksonalnog citoskeleta koji tvori mikrotubule. U AB, zbog pretjerane hiperfosforilacije tau proteina, dolazi do agregacije i stvaranja fibrilarnih snopića. Valja napomenuti da fibrilarni snopići nisu specifični za AB, međutim u AB se fosforilirani tau protein javlja prvo u hipokampalnoj regiji, a tek zatim u ostatku korteksa [3]. Razine p-tau i t-tau su izravni pokazatelji intenziteta neuralne i aksonalne degeneracije te oštećenja mozga. Povišene razine t-tau pokazuju povezanost s bržom progresijom MCI u AB te bržim napredovanjem kognitivnih oštećenja u oboljelih od AB. Najizraženije promjene su u oboljelih od brzoprogresivnih neurodegeneracijskih poremećaja poput Creutzfeldt-Jakobove bolesti (CJD) gdje su razine t-tau izrazitije povišene spram razina u oboljelih od AB. P-tau reflektira proces fosforilacije tau proteina te formiranje neurofibrilarnih snopića u mozgu, ali i sugerira hipokampalnu atrofiju mozga. Razine p-tau u likvoru oboljelih od CJD bolesti su normalne [40].

Mjerenjima razina t-tau u likvoru, vrijednosti > 600 pg/mL su razine koje se povezuju s AB dok jako visoke razine, > 3000 pg/mL su razine izmjerene u oboljelih od CJD. Izomer p-tau koji se najčešće mjeri u likvoru oboljelih od AB je p-tau 181 čija je granična vrijednost 60 pg/mL te ukoliko je viša od te vrijednosti uzima se kao značajan rezultat za postavljanje dijagnoze AB [41]. Mogu se određivati i p-tau 231 koji zajedno s p-tau 181 služi za razlikovanje AB od *frontotemporalne lobarne degeneracije*, *Lewy-body demencije* (LBD), *vaskularne demencije* ili depresije [41, 42].

Iako nespecifičan za AB, u drugim *taupatijama* nema vidljivog porasta fosforiliranog tau proteina. Također, p-tau se trenutno smatra najpouzdanijim biomarkerom budući da nema porasta razine osim u *herpes simplex encefalitisu* ili sideroze središnjeg živčanog sustava [43-45]. S druge strane, t-tau protein je opći pokazatelj neurodegeneracije. Viša razina t-tau u likvoru, označava veći stupanj oštećenja. Također nije specifičan za AB budući da se javlja u CJD, cerebrovaskularnom oštećenju i sl. bolestima mozga [40].

Povišene razine t-tau proteina u likvoru su uočene u 90% slučajeva MCI koji prelaze u AB što ga čini pouzdanim prognostičkim markerom napredovanja MCI u Alzheimerovu bolest [46]. Trenutno su ipak kombinacije razina t-tau, p-tau i  $A\beta_{42}$  najpouzdaniji pokazatelji za potvrdu dijagnoze AB te tako čine osjetljivost od čak 95% [47-49]. Može se koristiti i omjer  $A\beta_{42}/p$ -tau koji ima prediktivnu vrijednost za razvoj AB unutar 10 godina, međutim specifičnost i osjetljivost su nešto niže te iznose 85% [50, 51].

### **5.1.3. Omjer $A\beta_{1-42}$ / T-Tau**

Omjer  $A\beta_{1-42}/t$ -tau reflektira fiziološku povezanost  $A\beta_{1-42}$  i t-tau, te mu pozitivna prediktivna vrijednost iznosi iznad 95%, dok je negativna prediktivna vrijednost 90%, što ga čini izrazito osjetljivim i specifičnim za dijagnozu AB u odnosu na zdrave kontrole. Nadalje, smatra se najboljom mjerom budući da se povećava dijagnostička točnost u odnosu na mjerenja pojedinog biomarkera zasebno [52].

### **5.1.4. Visine-like protein 1 (VILIP-1)**

*Visine-like protein 1* je neuronski kalcijski senzorni protein koji sudjeluje u neuroprotekciji i neurotoksičnim procesima koji se odvijaju u mozgu. Povišene vrijednosti su uočene u brojnim neurodegenerativnim bolestima [54, 55]. Smatra se markerom za neuronsko oštećenje koji je otkriven potragom za proteinskim

biomarkerom specifičnim za mozak kroz *Genome-wide association studies* prilikom kojeg je uočen u stanjima koja dovode do oslobađanja VILIP-1 u likvor iz ozlijeđenih neurona [56]. Vrijednosti > 520 pg/mL se smatraju graničnim za oboljele od AB u odnosu na zdrave pojedince, a također korelira i s t-tau, p-tau 181 i volumenom mozga. Omjer VILIP-1/A $\beta$ <sub>42</sub> je također značajno različit u odnosu na zdravu populaciju što je potvrđeno i testiranjem s *Pittsburgh compound B* (PiB)- PET imaging metodom. Međutim, trenutno su potrebna dodatna mjerenja da se potvrdi točnost i usporede pozitivna i negativna prediktivna vrijednost s trenutnim zlatnim standardima [53]. Valja istaknuti da je dodatno istraživanje i proučavanje navedenog biomarkera ključno budući da se trenutno povezuje s kognitivnom funkcijom i progresijom same bolesti. Također, pokazuje negativnu korelaciju s lošim rezultatima MMSE, ali je značajno povećan u osoba s APOE mutacijama [57].

#### **5.1.5. YKL-40**

Povećane razine YKL-40 nalazimo u likvoru oboljelih od AB. Smatra se da je on zapravo inflamatorni biomarker kojeg secernira aktivirana mikroglija [59]. Novija istraživanja se nadovezuju na prethodno, međutim dodatno je došlo do spoznaje da ga mogu lučiti i astrociti čime se zapravo smanjuje značaj navedenog biomarkera. Također, povećane razine u AB nisu toliko značajne te se podosta preklapa s drugim inflamatornim bolestima poput multiple skleroze i sl. [60]. YKL-40 korelira pozitivno s razinama tau proteina, a negativno s kortikalnom debljinom mozga u regijama karakteristično zahvaćenim za AB. Zetterberg i sur. [61] navode da u slučaju da ga luči mikroglija se može povezati s AB. U slučaju lučenja iz astrocita, nema nikakvog značaja za dijagnozu AB. Nadalje, zapaženo je da YKL-40 nije povećan u Parkinsonovoj bolesti te stoga može služiti za razlikovanje ovih dvaju entiteta [62]. Vrijednosti YKL-40 mogu biti povišene i u vaskularnoj demenciji što dodatno smanjuje značaj [63].

Trenutno nema značajnu dijagnostičku točnost u usporedbi s A $\beta$  ili tau proteinima. Ipak, postoje naznake da bi se daljnjim istraživanjima ovog biomarkera moglo doći do spoznaje i poboljšanja razlikovanja AB u odnosu na druge demencije [62].

#### **5.1.6. Neurogranin (NGRN)**

Neurogranin je postsinaptički protein koji je eksprimiran pretežno u kortikalnim regijama te je povezan s kognicijom. Koncentriran je u dendritičkim spinovima u ekscitirajućim sinapsama čija je translokacija poremećena u AB. Smanjene razine NGRN-a pronalaze se u korteksu i hipokampalnoj regiji mozga, tj. mjestima karakterističnim za AB. Razine ovog proteina su povećane i u MCI i AB mjerene u likvoru. Povišene razine mogu biti i posljedica poremećena translokacije spinova. Značajnost i potencijal ovog biomarkera je velika, pogotovo u usporedbi s YKL-40 budući da ROC (eng. *Receiver operating characteristic curve*, grafički prikaz analize osjetljivosti i specifičnosti testa koja odvaja *test-positivne* od *test-negativnih* osoba) analizom se došlo do rezultata AUC (eng. *area under the curve*, površina ispod krivulje koja označava točnost testa) od 0.85 što ga svrstava u testove dobre specifičnosti i osjetljivosti čime se mogu razlikovati AB u odnosu na zdrave pojedince i druge bolesti [64].

Nadalje, posljednje studije su pokazale povišene koncentracije u AB, ali ne i u drugim neurodegenerativnim bolestima. Također, navedeni biomarker omogućava predviđanje progresije kognitivnog deficita, atrofiju i smanjenje aktivnosti glukoze u regijama hipokampusa i korteksa mozga. Također, s visokom točnošću i pouzdanošću može ukazati na gubitak sinapsi ili disfunkciju mozga u AB [65]. Sve navedeno ga čini potencijalno najznačajnijim i možebitno najperspektivnijim biomarkerom za ranu dijagnozu AB kao i za praćenje progresije bolesti.

### 5.1.7. Novi biomarkerski kandidati

Trenutno su u fazi istraživanja različiti proteini koji bi mogli povećati specifičnost i točnost dijagnoze AB. Smatra se da bi u bliskoj budućnosti neki od njih mogli zamijeniti do sada korištene zlatne standarde A $\beta$ <sub>1-42</sub> i tau proteine, omogućiti vrlo ranu dijagnozu AB te samim time i liječenje bolesti započeti što ranije i usporiti progresiju kognitivnog pogoršanja.

#### 5.1.7.1. BACE-1

*$\beta$ -site APP cleaving enzyme 1* (BACE-1) je  $\beta$ -sekretaza koja je važna za cijepanje APP proteina [66]. U MCI i AB povećana je produkcija A $\beta$  kao posljedica djelovanja navedenog enzima. Do toga dolazi zbog povećane ekspresije enzima koja je posljedica pozitivne povratne sprege, a rezultira povećanom enzimatskom aktivnošću i hiperprodukcijom A $\beta$  [67].

Količina navedenog enzima je povišena u osoba s AB u usporedbi sa zdravim kontrolama i oboljelim od drugih oblika demencija. Prema pojedinim istraživanjima, vrijednosti BACE-1 su povišene znatno u MCI i početnim stadijima AB, dok u kasnijim stadijima nema tolikog porasta [68, 69]. Druge studije međutim ne pokazuju razlike u odnosu na kontrole ili pak pronalaze povišene razine *BACE-1* u MCI, ali ne i u AB [70, 71]. BACE-1 bi potencijalno mogao biti izvrstan kandidat za ranu dijagnozu bolesti, međutim nisu provedene ekstenzivnije kliničke studije koje bi riješile navedene diskrepancije u rezultatima istraživanja.

#### 5.1.7.2. Omjer NGRN/BACE-1

Kao što je vidljivo u ranijem tekstu, kombinacijom više biomarkera postiže se veća specifičnost i osjetljivost za postavljanje dijagnoze AB, tj. bolja dijagnostička točnost. Jedan od potencijalnih omjera je i NGRN/BACE-1 budući da u korelaciju

stavlja dva najperspektivnija biomarkera, neurogranin i BACE-1. BACE-1 se zasebno smatra biomarkerom budućnosti za ranu dijagnozu AB, no ograničen je mogućnošću dijagnoze bolesti samo u ranim stadijima. S druge strane, NGRN je odličan za razlikovanje AB u odnosu na druge demencije, druge bolesti i zdrave pojedince, no nema značaja za ranu dijagnozu bolesti. Navedenim omjerom bi se omogućila i rana dijagnoza kao i praćenje progresije bolesti što je ustanovljeno korelacijom s godišnjim rezultatima MMSE [72].

### **5.1.7.3. A $\beta$ oligomeri**

Smatra se da su A $\beta$  oligomeri toksičniji za mozak nego li A $\beta$  fibrilarni agregati budući da mogu inhibirati potentnost hipokampalne regije dugoročno te uzrokovati abnormalnu fosforilaciju tau kao i neuritičku distrofiju. Razine A $\beta$  oligomera su samo 1% od ukupne količine A $\beta$  peptida, što ih čini jako teškim za kvantifikaciju. Razine su povišene i u mozgu i samim time i u likvoru. Postoji negativna korelacija između razine oligomera i kognitivnog statusa što ih čini izvrsnima za mjerenje stupnja razvijenosti AB. Također, razina oligomera raste s godinama života te korelira s razinama t-tau u kognitivno zdravih pojedinaca. Međutim, pojedini istraživači smatraju da pouzdanost rezultata treba razmatrati s oprezom budući da su korištene različite metodologije mjerenja kao i različiti oligomeri, što je dovelo do velike diskrepancije u rezultatima [73-80].

A $\beta$  oligomeri formiraju fibrilarne A $\beta$  u plakovima. Nadalje, topljivi A $\beta$  mogu inhibirati dugoročno potenciranje sinapsi te stoga imaju važnu ulogu u samoj patogenezi bolesti što bi ih u budućnosti moglo plasirati kao zlatni standard za dijagnozu AB. Ipak, sve navedeno treba razmatrati s oprezom budući da ih se pronalazi u znatno nižoj koncentraciji nego li monomere, ne pokazuju stabilnost, te je zapravo još upitno dovode li do svih navedenih promjena. Također, treba prilagoditi mjerne instrumente i standardizirati vrijednosti kako bi detekcija tih oligomera bila što preciznija, a vrijednost dijagnostičkog testirana opravdana [81-86].



#### 5.1.7.4. A $\beta$ skraćene izoforme

Neki od pokušaja dodatnog istraživanja amiloidne patogeneze AB, dovele su do pronalaska određenih izoformi tzv "krnjih" A $\beta$  peptida. Neki od njih su A $\beta$ <sub>1-40</sub>, A $\beta$ <sub>1-38</sub>, A $\beta$ <sub>1-14</sub>, A $\beta$ <sub>1-15</sub> i A $\beta$ <sub>1-16</sub>.

Za dijagnozu MCI A $\beta$ <sub>1-40</sub> nema značaja, međutim omjer A $\beta$ <sub>1-42</sub>/ A $\beta$ <sub>1-40</sub> može ukazivati na postojanje bolesti. Nadalje, povišene razine A $\beta$ <sub>1-38</sub> u kombinaciji sa sniženim razinama A $\beta$ <sub>1-42</sub> u likvoru bi mogao dodatno poboljšati dijagnozu AB. Za A $\beta$ <sub>1-14</sub>, A $\beta$ <sub>1-15</sub> i A $\beta$ <sub>1-16</sub> se smatra da su međuprodukti do sada neotkrivenog puta razgradnje APP proteina djelovanjem  $\alpha$ -sekretaze i  $\beta$ -sekretaze koje stvaraju skraćene forme A $\beta$ , dok  $\gamma$ -sekretaza producira dulje peptidne oblike od A $\beta$ <sub>1-17</sub> pa sve do A $\beta$ <sub>1-42</sub> [87].

#### 5.1.7.5. APP izoforme

Kao posljedica djelovanja enzima  $\alpha$ -sekretaze i  $\beta$ -sekretaze na APP protein, cijepanjem nastaju veliki topljivi aminoterminalni međuprodukti sAPP $\alpha$  i sAPP $\beta$ , ovisno o tome koji je enzim sudjelovao u metabolizmu APP. Dolazi do sekrecije sAPP $\alpha$  i sAPP $\beta$  u ekstracelularni prostor i samim time u likvor gdje se može pronaći u povišenim razinama [88].

Povišene razine sAPP $\beta$  pronalazimo i u MCI kao i u AB, kao i u oboljelih koji su iz MCI razvili AB, međutim ne postoji značajna razlika prema zdravim kontrolama i oboljelih koji su razvili neki drugi oblik demencije [90]. Smatra se da će navedeni metaboliti biti važni za praćenje učinka liječenja u kliničkim istraživanjima [89].

## 5.2. Biokemijski biomarkeri u plazmi i serumu

Dokazivanje AB upotrebom biomarkera iz krvi bi umnogome olakšalo i raniju dijagnozu, kao i praćenje progresije bolesti, odnosno učinka liječenja. Na žalost, dosadašnji pokušaji povezivanja nekih biomarkera iz krvi s dijagnozom AB se nisu pokazali uspješnima te se cerebrospinalna tekućina drži i dalje kao zlatni standard uz imaging metode za postavljanje dijagnoze AB [91].

Veliki je spektar prednosti koje bi pronalazak odgovarajućeg biomarkera u plazmi/serumu pridonio dijagnostičkoj obradi pacijenata s AB. Mnogi smatraju da je lumbalna punkcija invazivan postupak te da nije najbolji pristup za učestalo praćenje promjena biomarkera. Također, kako je krv zlatni standard i pretraga koja se koristi u svim granama medicine kao osnovni dijagnostički postupak, postoji inicijativa da se slično napravi i s biomarkerima za AB [92]. Pojednostavila bi se znatno dijagnoza, omogućilo bi se učestalo praćenje liječenja i progresije AB. Promjene u krvi specifične za AB su slabo vidljive i vrlo heterogene te je vidljiv širi spektar brojnih promjena koje su nevezane za AB. Za razvoj dijagnostike AB putem krvi potrebni su određeni uvjeti poput pronalaska visoko specifičnog i osjetljivog biomarkera u krvi, te standardizacija vrijednosti i omogućavanje njegove detekcije u različitim laboratorijima diljem svijeta s podjednakom točnošću [93].

### 5.2.1. A $\beta$ povezani proteini

Budući da je amiloidna patogeneza bolesti predominantna u razvoju simptoma i progresiji bolesti, najviše istraživani biomarker u plazmi je A $\beta$ . Provodile su se usporedbe u odnosu na likvorski nalaz A $\beta$ , međutim rezultati istraživanja su bili kontradiktorni. Pojedina istraživanja su pokazala neznatan porast A $\beta_{1-42}$  ili A $\beta_{1-40}$  peptida, dok većina istraživanja nije pronašla nikakve zadovoljavajuće poraste u plazmi oboljelih od AB [94-96]. Naime, veliki problem u detekciji A $\beta$  u plazmi je prvo nepropusnost KMB, a ono malo A $\beta$  što prijeđe u krv

se uglavnom veže za proteine plazme zbog svoje hidrofobne prirode. Mnogi lijekovi također utječu na razine A $\beta$ . Razine u krvi variraju kroz vrijeme i ovisno o pojedincu i stadiju bolesti, što nije pogodno za ranu detekciju AB [97-98]. Nadalje, mnoga periferna tkiva proizvode svojim metabolizmom A $\beta$ . Trombociti sadrže visoke razine A $\beta$  budući da ekspimiraju APP i sekretaze, dok pojedini enzimi u plazmi također i razgrađuju A $\beta$  peptide što dodatno onemogućuje kvalitetnu kvantifikaciju A $\beta$  kojom bi se moglo dijagnosticirati AB [99-101].

Humpel dalje navodi da su razine A $\beta$  peptida povišene u plazmi oboljelih s familijarnim oblikom bolesti, kao i osoba s Downovim sindromom, dok su rezultati varijabilni u sporadičnim oblicima bolesti. Navodi i da A $\beta$ <sub>1-42</sub> i A $\beta$ <sub>1-40</sub> mogu biti i povišen i sniženi, ali i nepromijenjeni u odnosu na zdrave kontrole [92].

Uočen je značajan porast A $\beta$ <sub>1-42</sub> u žena s MCI, dok u muškaraca nema te povezanosti [102]. Također, u krvi su pronađena snižena A $\beta$ <sub>1-42</sub> protutijela međutim nije nađena korelacija razina A $\beta$  i A $\beta$  protutijela između seruma i likvora te su potrebna dodatna ekstenzivnija istraživanja [103]. Nadalje, autofagosomalna degradacija intracelularnih komponenti lizosomalnim putem je poremećena u AB te stoga makrofagi i monociti slabo fagocitiraju A $\beta$  za razliku od zdravih kontrola. Mogu se detektirati fagociti s A $\beta$  *in vitro* izlaganjem fluorescentnom A $\beta$ . Monociti se mogu detektirati imunofluorescentnim bojenjem s anti-CD68 te su vidljivi protočnom citometrijom [104].

### **5.2.2. Enzimi povezani s tau patologijom**

Kako su u AB poremećene i promijenjene funkcije protein-kinaza i fosfataza, *glikogen sintaza kinaza 3 (GSK-3)* je naročito povišena u leukocitima u AB i MCI, dok je pak u perifernim mononuklearnim stanicama smanjena razina što pokazuje izrazitu varijabilnost. Nadalje, protein kinaza C (PKC) je također promijenjena u fibroblastima, limfocitima i eritrocitima u AB što potvrđuje stajalište da se u perifernim stanicama može pronaći biomarker za ranu dijagnozu AB

[105-107]. Za razliku od enzima povezanih s tau proteinom, mjerenja t-tau i p-tau nemaju dijagnostičkog značaja u dijagnozi AB. Smatra se da bi se analizom leukocita moglo povezati AB s promjenama u krvi, međutim ta analiza je podosta zahtjevna budući da su potrebni sterilni uvjeti za uzgoj [92].

### 5.2.3. Biomarkeri neuroinflamacije

Kod AB se u mozgu odvija proces neuroinflamacije pri kojem dolazi do aktivacije mikroglije i ekspresije proinflamatornih citokina koji dovode do smrti neurona [108]. U plazmi je detektirana povezanost brojnih proteina plazme s amiloidnim procesom u mozgu [109, 110].

Između ukupno 120 testiranih proteina *sandwich Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)* metodom, 18 biomarkera (među kojima su citokini, kemokini, faktori rasta, i dr.) su povezani s AB i MCI sa specifičnošću od čak 90% [111]. Međutim, dodatnim testiranjem 16 od navedenih 18 koji su podvrgnuti *multiplex searchlight ELISA* metodom nisu pokazivala toliko povoljne rezultate kao prethodno istraživanje te je dokazana specifičnost od samo 60%. Odgovor na pitanje koje se postavlja zbog tolike razlike u rezultatima može ležati u različitim metodama mjerenja i različitim instrumentima tako da oba rezultata treba posmatrati s oprezom [92].

### 5.2.4. Ostali povezani markeri

Pojedina istraživanja su pokazala povezanost zakazivanja ubikvitinsko-proteosomskog procesa s A $\beta$  toksičnošću. Također, uočene su povećane koncentracije ubikvitina u AB, i u korteksu i u likvoru [92]. Navedeno značajno korelira sa stupnjem neurofibrilarnih promjena u tkivima. U CD45<sup>+</sup> T limfocitima ubikvitinsko-proteosomski mehanizam je smanjen starenjem. Također, u perifernoj krvi mononuklearne stanice su pokazale promjene u proteosomskoj aktivnosti enzima [114]. Stanično starenje se uzima kao odgovor na stres koji

dovodi do raznih promjena u stanici, poput skraćivanja telomera [118, 119, 121]. Stoga, u pacijenata oboljelih od AB i vaskularne demencije pronađene su u krvi skraćene telomere u odnosu na sparene kontrole. Nadalje, smatra se da fibroblasti u sporadičnom AB specifično eksprimiraju anomalni p53 ("mutant-like p53") koji omogućava detekciju AB u odnosu na druge bolesti [119]. Periferna krvna zrnca u AB također pokazuju i posebnu osjetljivost k apoptozi. Naime, uočena je pojačana apoptoza u CD4<sup>+</sup> T limfocita i *Natural Killer* (NK) stanica [116], koja je praćena i pojačanom ekspresijom anti-apoptotičnog proteina Bcl-2, SOD2 i raznih podtipova kaspaza [117]. U AB dolazi i do oštećenja cerebrovaskularnog sustava koje uključuje i KMB i neurovaskularne jedinice što dovodi do smanjene opskrbe tkiva mozga energetskih supstratima, uz redovitu pojavu tzv. "tihih" moždanih udara. Slijedom navedenoga, mjerenjem biomarkera povezanih s cerebrovaskularnim oštećenjima može pružiti osjetljive instrumente za dijagnosticiranje AB [122]. Također, uočene su znatno povišene razine C-reaktivnog proteina (CRP) kao prediktori kognitivnog pogoršanja i demencije [112].

Valja spomenuti da povišene razine homocisteina u plazmi u kombinaciji sa sniženim folatima i vitaminom B12 su biomarkeri koji nas više upućuju na postojanje vaskularne demencije umjesto AB [113].

Smatra se da bi u budućnosti detaljnija istraživanja vazodilatatora ili vazokonstriktora (npr. pro-adrenomodulin, pro-atrijski neurouretski peptid, C-terminalni endotelin 1 prekursorski fragment i sl.), te stanično - adherirajućih molekula (VCAM-1) i intercelularnih adherirajućih molekula (ICAM-1, ICAM-3, P-selektin) mogla doprinijeti poboljšanoj dijagnostici AB [114].

### **5.3. Ostali biokemijski biomarkeri**

U literaturi se osim uzoraka krvi i likvora spominju još i uzorci sline te urina kao mogući pogodni izvori biomarkera u budućnosti zbog neinvazivnosti uzimanja

uzoraka, lake dostupnosti, niske cijene i brzine provedbe postupka. Međutim, za detekciju AB u navedenim uzorcima potrebne su jako senzitivne metode koje bi detektirale i jako niske razine proteina povezanih s AB. Također, trenutno se razmatra da li je AB patologija uopće i povezana s navedenim sustavima te treba dodatno istražiti potencijal ovih uzoraka [92].

## 6. Zaključak

Trenutno se dijagnoza AB rutinski postavlja (hetero)anamnezom, kognitivnim pregledom i neuropsihološkim testiranjem uz pomoć dodatnih dijagnostičkih metoda (neuroradioloških te isključivanjem drugih uzroka kognitivnog oštećenja) kod klinički već izraženih kognitivnih ispada, tj. u simptomatskoj fazi bolesti.

Kako bi se omogućila što ranija detekcija AB i započelo liječenje, potrebno je razviti lako dostupne i jeftine metode za dokazivanje bolesti u predsimptomatskoj fazi. Iako se sigurna dijagnoza postavlja tek *post mortem*, korištenjem biomarkera iz likvora i krvi moglo bi se prikazati patološki proces i promjene u mozgu koje se zbivaju u bolesti prije razvoja samih simptoma. Osim rane detekcije bolesti, omogućilo bi se i rani početak liječenja bolesti s potencijalno novim lijekovima koji modificiraju/usporevaju/zaustavljaju navedenu patogenetsku kaskadu.

Iako su od biokemijskih markera trenutno biomarkeri iz likvora pouzdaniji i točniji, postoje naznake u novijim kliničkim istraživanjima kako bi se navedene patološke procese koji se odvijaju u AB moglo otkriti i putem krvi što bi znatno pojednostavilo dijagnosticiranje budući da je krv lakše dostupna i zlatni standard za dijagnozu u svim granama medicine.

## 7. Literatura

1. Hrvatski zavod za javno zdravstvo: Hrvatski zdravstveno-statistički ljetopis za 2016. godinu. Stevanović R, Capak K, ur. (Internet) Zagreb: Hrvatski zavod za javno zdravstvo; 2017. (Pristupljeno 27.11.2017.). Dostupno na: [https://www.hzjz.hr/wp-content/uploads/2018/01/Ljetopis\\_2016\\_IX.pdf](https://www.hzjz.hr/wp-content/uploads/2018/01/Ljetopis_2016_IX.pdf)
2. Apostolova LG, DeKosky ST, Cummings JL. Dementias. U: Daroff RB, Fenichel GM, Jankovic J, i sur., urednici: Bradley's neurology in clinical practice. 6. izd., Elsevier 2012;Str.1534-82.
3. Honig LS, Small SA, Mayeux R. Alzheimer disease. U: Louis ED, Mayer SA, Rowland LP, urednici: Merritt's neurology 2015;Str.770-821.
4. Ballard C, Gauthier S, Corbett A, i sur. Alzheimer's disease. The Lancet 2011;377(9770):1019-31.
5. Wilkinson I, Lennox G. Dementias. U: Wilkinson I, Lennox G, urednici. Essential neurology 4. izd 2005;Str.224-37.
6. Blennow K, de Leon MJ, Zetterberg H. Alzheimer's disease. Lancet 2006;368: 387- 403.
7. Masliah E, Hansen L, Adame A, i sur. Abeta vaccination effects on plaque pathology in the absence of encephalitis in Alzheimer disease. Neurology 2005;64(1):129-131.
8. Nicoll JA, Wilkinson D, Holmes C, i sur. Neuropathology of human Alzheimer disease after immunization with amyloid-beta peptide: a case report. Nat Med 2003;9(4):448-452.
9. 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;19:109–116.
10. Frey HJ. Problems associated with biological markers of Alzheimer's disease. Neurochemical Res. 2005;30:1501–1510.
11. Henley SMD. Biomarkers for neurodegenerative diseases. Curr. Opin. Neurol. 2005;18:698–705.



12. Sprott RL. Biomarkers of aging and disease: introduction and definitions. *Exp. Gerontol.* 2010;45:2–4.
13. Cedazo-Minguez A. Biomarkers of Alzheimer's disease and other forms of dementia: clinical needs, limitations and future aspects. *Exp. Gerontol.* 2010;45:5–14.
14. Ho L. Alzheimer's disease biomarker discovery in symptomatic and asymptomatic patients: Experimental approaches and future clinical applications. *Exp. Gerontol.* 2010;45:15–22.
15. Jack Jr CR, Bennett DA, Blennow K, i sur. An unbiased descriptive classification scheme for Alzheimer disease biomarkers. *Neurology.* 2016;87:539–47.
16. Dubois B, Hampel H, Feldman HH, i sur. Proceedings of the Meeting of the International Working Group (IWG) and the American Alzheimer's Association on “The Preclinical State of AD”; July 23, 2015; Washington DC, USA. *Alzheimers Dement.* 2016;12:292–323.
17. 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.
18. Arnerić SP, Batrla-Utermann R, Beckett L, i sur. Cerebrospinal fluid biomarkers for Alzheimer's disease: a view of the regulatory science qualification landscape from the Coalition Against Major Diseases CSF Biomarker Team. *J Alzheimers Dis.* 2017;55:19–35.
19. Chételat G, La Joie R, Villain N, i sur. Amyloid imaging in cognitively normal individuals, at-risk populations and preclinical Alzheimer's disease. *Neuroimage Clin.* 2013;2:356–65.
20. Siemers E, Sundell K, Carlson C, i sur. Phase 3 solanezumab trials: secondary outcomes in mild Alzheimer's disease patients. *Alzheimers Dement.* 2016;12:110–20.
21. Petersen RC, Aisen P, Boeve BF, i sur. Mild cognitive impairment due to Alzheimer disease in the community. *Ann Neurol.* 2013;74:199–208.

22. Hampel H. Biomarkers for Alzheimer's disease: academic, industry and regulatory perspectives. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2010;9:560–574.
23. Blennow K. Cerebrospinal fluid protein biomarkers for Alzheimer's disease. *NeuroRx* 2004;1:213–225.
24. Hansson O, Zetterberg H, Buchhave P, i sur. Association between CSF biomarkers and incipient Alzheimer's disease in patients with mild cognitive impairment: a follow-up study. *Lancet Neurol.* 2006;5(4):228–234.
25. Maddalena A, Papassotiropoulos A, Müller-Tillmanns B, i sur. Biochemical diagnosis of Alzheimer disease by measuring the cerebrospinal fluid ratio of phosphorylated tau protein to  $\beta$ -amyloid peptide<sub>42</sub>. *Arch. Neurol.* 2003;60:1202–1206.
26. Mattsson N, Zetterberg H, Hansson O, i sur. CSF biomarkers and incipient Alzheimer disease in patients with mild cognitive impairment. *JAMA* 2009;302:385–393.
27. Blennow K, Hampel H. CSF markers for incipient Alzheimer's disease. *Lancet Neurol.* 2003;2:605–613.
28. Blennow K. CSF biomarkers for Alzheimer's disease: use in early diagnosis and evaluation of drug treatment. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 2005;5:661–672.
29. Engelborghs S, De Vreese K, Van de Castele T, i sur. Diagnostic performance of a CSF-biomarker panel in autopsy-confirmed dementia. *Neurobiol. Aging* 2008;29:1143–1159.
30. Forman MS, Farmer J, Johnson JK, i sur. Frontotemporal dementia: clinicopathological correlations. *Ann. Neurol.* 2006;59:952–962.
31. Price JL, Morris JC. Tangles and plaques in nondemented aging and "preclinical" Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* 1999;45:358–368.
32. Kotzbauer PT, Trojanowski JQ, Lee VM. Lewy body pathology in Alzheimer's disease. *J. Mol. Neurosci.* 2001;17:225–232.
33. Schneider JA, Arvanitakis Z, Leurgans SE, i sur. The neuropathology of probable Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Ann Neurol.* 2009;66(2):200-8.

34. Taylor JP, Hardy J, Fischbeck KH. Toxic proteins in neurodegenerative disease. *Science* 2002;296:1991–5.
35. Blennow K, Mattsson N, Scholl M, i sur. Amyloid biomarkers in Alzheimer's disease. *Trends Pharmacol Sci* 2015;36:297-309.
36. Olsson B, Lautner R, Andreasson U, i sur. CSF and blood biomarkers for the diagnosis of Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Neurol.* 2016;15(7):673-684.
37. De Jong D, Jansen RW, Kremer BPH, i sur. Cerebrospinal fluid amyloid beta42/phosphorylated tau ratio discriminates between Alzheimer's disease and vascular dementia. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2006;61:755–8.
38. Mulder C, Verwey NA, van der Flier WM, i sur. Amyloid-beta(1-42), total tau, and phosphorylated tau as cerebrospinal fluid biomarkers for the diagnosis of Alzheimer disease. *Clin Chem* 2010;56:248–53.
39. van Harten AC, Visser PJ, Pijnenburg YA, i sur: Cerebrospinal fluid Abeta42 is the best predictor of clinical progression in patients with subjective complaints. *Alzheimers Dement.* 2013;9(5):481-7.
40. 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;225:210–212.
41. Hampel H. Total and phosphorylated tau protein as biological markers of Alzheimer's disease. *Exp. Gerontol.* 2010;45:30–40.
42. Cedazo-Minguez A. Biomarkers of Alzheimer's disease and other forms of dementia: clinical needs, limitations and future aspects. *Exp. Gerontol.* 2010;45:5–14.
43. Grahn A, Hagberg L, Nilsson S, i sur. Cerebrospinal fluid biomarkers in patients with varicella-zoster virus CNS infections. *J Neurol* 2013;260:1813-1821.
44. Ikeda T, Noto D, Noguchi-Shinohara M, i sur. CSF tau protein is a useful marker for effective treatment of superficial siderosis of the central nervous system: two case reports. *Clin Neurol Neurosurg* 2010;112:62-64.

45. Kondziella D, Zetterberg H. Hyperphosphorylation of tau protein in superficial CNS siderosis. *J Neurol Sci* 2008;273:130-132.
46. Karch CM, Jeng AT, Goate AM. Extracellular tau levels are influenced by variability in tau that is associated with tauopathies. *J Biol Chem* 2012;287:42751–62.
47. Clark CM, Xie S, Chittams J, et al. Cerebrospinal fluid tau and  $\beta$ -amyloid: how well do these biomarkers reflect autopsy-confirmed dementia diagnoses? *Arch. Neurol.* 2003;60:1696–1702.
48. Bian H, Van Swieten JC, Leight S, et al. CSF biomarkers in frontotemporal lobar degeneration with known pathology. *Neurology* 2008;70:1827–1835.
49. Sunderland T, Linker G, Mirza N, et al. Decreased  $\beta$ -amyloid<sub>1–42</sub> and increased tau levels in cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer disease. *JAMA* 2003;289:2094–2103.
50. Buchhave P, Minthon L, Zetterberg H, et al. Cerebrospinal fluid levels of beta-amyloid 1–42, but not of tau, are fully changed already 5 to 10 years before the onset of Alzheimer dementia. *Arch Gen Psychiatry* 2012;69:98–106.
51. Hertze J, Minthon L, Zetterberg H, et al. Evaluation of CSF biomarkers as predictors of Alzheimer's disease: a clinical follow-up study of 4.7 years. *J Alzheimer's disease JAD* 2010;21:1119–1128.
52. Lloret A, Badia MC, Giraldo E, et al. Amyloid- $\beta$  toxicity and tau hyperphosphorylation are linked via RCAN1 in Alzheimer's disease. *JAlzheimers Dis* 2011;27:701–9.
53. Vlassenko AG, Benzinger TLS, Morris JC. PET amyloid-beta imaging in preclinical Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta* 2012;1822:370–9.
54. Braunewell KH, Szanto AJK. Visinin-like proteins (VSNLs): interaction partners and emerging functions in signal transduction of a subfamily of neuronal Ca<sup>2+</sup>-sensor proteins. *Cell Tissue Res* 2009;335:301–16.
55. Schnurra I, Bernstein HG, Riederer P, et al. The neuronal calcium sensor protein VILIP-1 is associated with amyloid plaques and extracellular tangles in Alzheimer's disease and promotes cell death and tau phosphorylation in vitro:

- a link between calcium sensors and Alzheimer's disease? *Neurobiol Dis* 2001;8:900–9.
56. Laterza OF, Modur VR, Crimmins DL, i sur. Identification of novel brain biomarkers. *Clin. Chem.* 2006;52:1713–1721.
  57. Lee JM, Blennow K, Andreasen N, i sur. The brain injury biomarker VLP-1 is increased in the cerebrospinal fluid of Alzheimer disease patients. *Clin. Chem.* 2008;54:1617–1623.
  58. Gupta VB. Plasma apolipoprotein E and Alzheimer disease risk. *Neurology* 2011;76:1091–8.
  59. Bonneh-Barkay D, Bissel SJ, Wang G, i sur: YKL-40, a marker of simian immunodeficiency virus encephalitis, modulates the biological activity of basic fibroblast growth factor. *The American journal of pathology* 2008;173:130–143.
  60. Craig-Schapiro R, Perrin RJ, Roe CM, i sur. YKL-40: a novel prognostic fluid biomarker for preclinical Alzheimer's disease. *Biol Psychiatry* 2010;68:903-912.
  61. Alcolea D, Vilaplana E, Pegueroles J, i sur. Relationship between cortical thickness and cerebrospinal fluid YKL-40 in prodementia stages of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 2015;36:2018–2023.
  62. Wennström M, Surova Y, Hall S, i sur. The inflammatory marker YKL-40 is elevated in cerebrospinal fluid from patients with Alzheimer's but not Parkinson's disease or dementia with Lewy bodies. *PLoS One* 2015;10:e0135458.
  63. Olsson B, Hertze J, Lautner R, i sur. Microglial markers are elevated in the prodromal phase of Alzheimer's disease and vascular dementia. *J Alzheimers Dis* 2013;33:45–53.
  64. Hellwig K, Kvartsberg H, Portelius E, i sur. Neurogranin and YKL-40: independent markers of synaptic degeneration and neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Alzheimers Res Ther* 2015;7:74.
  65. Portelius E, Zetterberg H, Skillback T, i sur. Cerebrospinal fluid neurogranin: relation to cognition and neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Brain* 2015;138:3373-3385.

66. Holsinger RM, McLean CA, Collins SJ, i sur: Increased beta- Secretase activity in cerebrospinal fluid of Alzheimer's disease subjects. *Ann Neurol* 2004;55:898–899.
67. Yang LB, Lindholm K, Yan R, i sur. Elevated  $\beta$ -secretase expression and enzymatic activity detected in sporadic Alzheimer disease. *Nat. Med.* 2003;9:3–4.
68. Holsinger RM, McLean CA, Collins SJ, i sur. Increased beta-secretase activity in cerebrospinal fluid of Alzheimer's disease subjects. *Ann Neurol* 2004;55:898–899.
69. Verheijen JH, Huisman LG, van Lent N, Neumann U, i sur. Detection of a soluble form of BACE-1 in human cerebrospinal fluid by a sensitive activity assay. *Clin Chem* 2006;52:1168–1174.
70. Holsinger RM, Lee JS, Boyd A, i sur. CSF BACE1 activity is increased in CJD and Alzheimer disease versus [corrected] other dementias. *Neurology* 2006;67:710–712.
71. Zhong Z, Ewers M, Teipel S, i sur. Levels of beta-secretase (BACE1) in cerebrospinal fluid as a predictor of risk in mild cognitive impairment. *Arch Gen Psychiatry* 2007;64:718–726.
72. De Vos A, Struyfs H, Jacobs D, i sur. The cerebrospinal fluid neurogranin/BACE1 ratio is a potential correlate of cognitive decline in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 2016;53:1523–38.
73. Sakono M, Zako T. Amyloid oligomers: formation and toxicity of Abeta oligomers. *FEBS J* 2010;277:1348–1358.
74. Walsh DM, Klyubin I, Fadeeva JV, i sur. Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature* 2002;416:535–539.
75. Zempel H, Thies E, Mandelkow E, i sur. Abeta oligomers cause localized Ca(2+) elevation, missorting of endogenous Tau into dendrites, Tau phosphorylation, and destruction of microtubules and spines. *J Neurosci* 2010;30:11938–11950.

76. Jin M, Shepardson N, Yang T, i sur: Soluble amyloid beta-protein dimers isolated from Alzheimer cortex directly induce Tau hyperphosphorylation and neuritic degeneration. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011;108:5819–5824.
77. De Felice FG, Wu D, Lambert MP, i sur. Alzheimer's Disease-type neuronal tau hyperphosphorylation induced by a beta oligomers. *Neurobiol aging* 2008;29:1334–1347.
78. Bruggink KA, Jongbloed W, Biemans EA, i sur. Amyloid-beta oligomer detection by ELISA in cerebrospinal fluid and brain tissue. *Anal Biochem* 2013; 433:112–120.
79. Shankar GM, Li S, Mehta TH, i sur. Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nat Med* 2008;14:837–842.
80. Gao CM, Yam AY, Wang X, i sur. Abeta40 oligomers identified as a potential biomarker for the diagnosis of Alzheimer's disease. *PLoS One* 2010;5:e15725.
81. Fukumoto H, Tokuda T, Kasai T, i sur. High-molecular-weight beta-amyloid oligomers are elevated in cerebrospinal fluid of Alzheimer patients. *FASEB J* 2010; 24:2716–2726.
82. Georganopoulou DG, Chang L, Nam JM, i sur. Nanoparticle-based detection in cerebral spinal fluid of a soluble pathogenic biomarker for Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:2273–2276.
83. Pitschke M, Prior R, Haupt M, i sur. Detection of single amyloid beta- protein aggregates in the cerebrospinal fluid of Alzheimer's patients by fluorescence correlation spectroscopy. *Nat Med* 1998;4:832–834.
84. Bruggink KA, Jongbloed W, Biemans EA, i sur. Amyloid-beta oligomer detection by enzyme-linked immunosorbent assay in cerebrospinal fluid and brain tissue. *Anal Biochem* 2012;433:112–120.
85. Santos AN, Ewers M, Minthon L, i sur. Amyloid-beta oligomers in cerebrospinal fluid are associated with cognitive decline in patients with Alzheimer's disease. *J Alzheimer's dis JAD* 2012;29:171–176.

86. Yang T, Hong S, O'Malley T, i sur. New ELISAs with high specificity for soluble oligomers of amyloid beta-protein detect natural Abeta oligomers in human brain but not CSF. *Alzheimers Dement* 2013;9:99–112.
87. Portelius E, Price E, Brinkmalm GA, i sur. A novel pathway for amyloid precursor protein processing. *Neurobiol. Aging* 2011;32:1090–8.
88. Olsson A, Höglund K, Sjögren M, i sur. Measurement of  $\alpha$ - and  $\beta$ -secretase cleaved amyloid precursor protein in cerebrospinal fluid from Alzheimer patients. *Exp. Neurol.* 2003;183:74–80.
89. Lewczuk P, Kamrowski-Kruck H, Peters O, i sur. Soluble amyloid precursor proteins in the cerebrospinal fluid as novel potential biomarkers of Alzheimer's disease: a multicenter study. *Mol. Psychiatry* 2010;15(2):138-45.
90. Blennow K, Hampel H, Weiner M, i sur. Cerebrospinal fluid and plasma biomarkers in Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol* 2010;6:131–144.
91. Blennow K. Cerebrospinal fluid and plasma biomarkers in Alzheimer disease. *Nat. Rev. Neurol.* 2010;6:131–144.
92. Humpel C. Identifying and validating biomarkers for Alzheimer's disease. *Trends Biotechnol* 2011;29:26–32.
93. Demarin V, Zavoreo I, Kes VB, i sur. Biomarkers in Alzheimer's disease. *Clin Chem Lab Med* 2011;49:773–8.
94. Mayeux R, Honig LS, Tang MX, i sur. Plasma A $\beta$ 40 and A $\beta$ 42 and Alzheimer's disease: relation to age, mortality and risk. *Neurology* 2003;61:1185–1190.
95. Pomara N, Willoughby LM, Sidtis JJ, i sur. Selective reductions in plasma A $\beta$  1–42 in healthy elderly subjects during longitudinal follow-up: a preliminary report. *Am. J. Geriatr. Psychiatry* 2005;13:914–917.
96. van Oijen M, Hofman A, Soares HD, i sur. Plasma A $\beta$ 1–40 and A $\beta$ 1–42 and the risk of dementia: a prospective case-cohort study. *Lancet Neurol.* 2006;5:655–660.
97. Kuo, Y. M. et al. High levels of circulating A $\beta$ 42 are sequestered by plasma proteins in Alzheimer's disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1999;257:787–791.



98. Mehta PD, Pirttilä T, Mehta SP, i sur. Plasma and cerebrospinal fluid levels of amyloid  $\beta$  proteins 1–40 and 1–42 in Alzheimer disease. *Arch. Neurol.* 2000;57:100–105.
99. Carrillo MC, Blennow K, Soares H, i sur. Global standardization measurement of cerebral spinal fluid for Alzheimer's disease: an update from the Alzheimer's association global biomarkers consortium. *Alzheimer's dementia j Alzheimer's Assoc* 2013;9:137–140.
100. Tang K. Platelet amyloid precursor protein processing: a bio-marker for Alzheimer's disease. *J. Neurol. Sci.* 2006;240:53–58.
101. Borroni B. Blood cell markers in Alzheimer's disease: amyloid precursor protein form ratio in platelets. *Exp. Gerontol.* 2010;45:53–56.
102. Assini A, Cammarata S, Vitali A, i sur. Plasma levels of amyloid beta-protein 42 are increased in women with mild cognitive impairment. *Neurology* 2004;63(5):828-31.
103. Gustaw-Rothenberg K.A. Dissociated amyloid- $\beta$  antibody levels as a serum biomarker for the progression of Alzheimer's disease: a population-based study. *Exp. Gerontol.* 2010;45:47–52.
104. Fiala M. Biomarkers of inflammation and amyloid-beta phagocytosis in patients at risk of Alzheimer disease. *Exp. Gerontol.* 2010;45:57–63.
105. Hye A. Glycogen synthase kinase-3 is increased in white cells early in Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* 2005;373:1–4.
106. Marksteiner J. Glycogen-synthase kinase-3 $\beta$  is decreased in peripheral blood mononuclear cells of patients with mild cognitive impairment. *Exp. Gerontol.* 2009;44:370–371.
107. de Barry J. Protein kinase C as a peripheral biomarker for Alzheimer's disease. *Exp. Gerontol.* 2010;45:64–69.
108. Ray S. Classification and prediction of clinical Alzheimer's diagnosis based on plasma signaling proteins. *Nat. Med.* 2007;13:1359–1362.
109. Burnham SC, Rowe CC, Baker D, i sur. Predicting Alzheimer disease from a blood-based biomarker profile: A 54-month follow-up. *Neurology* 2016;87:1093-1101.

110. Voyle N, Baker D, Burnham SC, i sur. Blood Protein Markers of Neocortical Amyloid-beta Burden: A Candidate Study Using SOMAScan Technology. *J Alzheimers Dis* 2015;46:947-961.
111. Ray S, Britschgi M, Herbert C, i sur. Classification and prediction of clinical Alzheimer's diagnosis based on plasma signaling proteins. *Nat Med* 2007;13:1359-62.
112. Kuo HK. Relation of C-reactive protein to stroke, cognitive disorders, and depression in the general population: systematic review and meta-analysis. *Lancet Neurol.* 2005;4:371-380.
113. Clarke R. Folate, vitamin B12, and serum total homocysteine levels in confirmed Alzheimer disease. *Arch Neurol.* 1998;55:1449-1455.
114. Hochstrasser T. Soluble cell adhesion molecules in monocytes of Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Exp. Gerontol.* 2010;45:70-74.
115. Thambisetty M. Blood-based biomarkers of Alzheimer's disease: challenging but feasible. *Biomark. Med.* 2010;4:65-79.
116. Schindowski K. Apoptosis of CD4+ T and natural killer cells in Alzheimer's disease. *Pharmacopsychiatry.* 2006;39:220-228.
117. Tacconi S. Increased caspase activation in peripheral blood mononuclear cells of patients with Alzheimer's disease. *Exp. Neurol.* 2004;190:254-262.
118. Panossian LA. Telomere shortening in T cells correlates with Alzheimer's disease status. *Neurobiol. Aging.* 2003;24:77-84.
119. von Zglinicki T. Short telomeres in patients with vascular dementia: an indicator of low antioxidative capacity and a possible risk factor? *Lab. Invest.* 2000;80:1739-1747.
120. Lanni C. Unfolded p53: a potential biomarker for Alzheimer's disease. *J. Alzheimer's Dis.* 2007;12:93- 99.
121. Bergman M. Are peripheral blood cells from patients with Alzheimer disease more sensitive to apoptotic stimuli? *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.* 2002;16:156-160.
122. Ewers M. Blood-based biomarkers of microvascular pathology in Alzheimer's disease. *Exp. Gerontol.* 2010;45:75-79.

## 8. Životopis

Nikola Šoštar je rođen 07.01.1992. u Zagrebu. Nakon završene Osnovne škole "Ante Kovačić" i "V Gimnazije". 2010. godine upisuje Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Od 2010. godine član je CroMSIC-a u sklopu kojeg od 2015. godine volontira u projektima *Linija za rijetke bolesti* u suradnji sa Savezom za rijetke bolesti, te *Pogled u sebe* koji se bavi promicanjem mentalnog zdravlja mladih, ponajprije srednjoškolaca. Također, piše za studentski časopis *Medicinar* od 2012. do 2017. godine. Aktivno se služi engleskim i španjolskim jezikom, pasivno i njemačkim jezikom. Područja interesa u medicini su mu neurologija i psihijatrija.

## 9. Zahvale

Posebno se zahvaljujem svojoj mentorici doc. dr. sc. Marini Boban na iskazanom interesu, pristupačnosti, strpljenju i svojoj pomoći prilikom izrade ovog diplomskog rada. Također bih joj htio zahvaliti što je dodatno razbuknula moj interes za područje demencija koje mi je oduvijek bilo interesantno.

Veliko hvala mojoj obitelji koja je bila uz mene i u dobrim i u teškim trenucima tokom studija, te na podršci i strpljenju koje su mi pružili naročito tokom putovanja bijelim svijetom. I posebno hvala najljepšoj pesici na svijetu, *Lily*, koja je uljepšala zadnje 2 godine naših života, kada nam je svima bilo najteže, i bez koje danas ne možemo ni zamisliti život!

Od srca hvala svim mojim prijateljima i kolegama sa fakulteta koji su me pratili tokom studija (i trenutnim i bivšim), *jer prijatelji su obitelj koju sami biramo*. Od prijave studija na *postani-student* jedne Novogodišnje noći (i skoro studiranja rumunjskog) pa sve do dana kada konačno postajem *dr. med.* Kroz uspone i padove, mnogo dobrih i loših trenutaka kako to uvijek biva u životu, uz suze, osmijeh, bijes, razočaranja, duge besane noći i što sve nismo zajedno prošli... Kroz najteže trenutke, bili su tu uz mene. Kao bezuvjetna podrška. Ne ću imenovati nikoga, znaju tko su.

Ipak, najveću zahvalu upućujem dr. Sandri koja me naučila da se *vremena ne mijenjaju nego se mijenjaju samo ljudi - i to samo ako žele*. Također, u njoj sam pronašao *uzor* liječnika kakav želim biti jednoga dana - pun empatije i razumijevanja, uvijek pristupačan i dostupan, i zadovoljan svojim poslom. Ne želim ni zamisliti gdje bih sada bio da nam se nisu ukrstili putevi. Najveća joj hvala za svu pomoć koju mi je iskazala kada mi je bilo najteže.

*Sve u životu se događa iz nekog razloga. Ali je ponekad život jednostavno sastavljen od niza slučajnosti.*

**THE END.**