

# Ekspresija moždanog neurotrofnog čimbenika u Alzheimerovoj bolesti

---

**Bišof, Kristina**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2023**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:703457>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-19**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



Kristina Bišof

Ekspresija moždanog neurotrofnog čimbenika u  
Alzheimerovoj bolesti

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2023. godina.

Ovaj je rad izrađen u Laboratoriju za molekularnu neuropsihijatriju, na Zavodu za molekularnu medicinu, na Institutu Ruđer Bošković u Zagrebu, pod vodstvom doc. dr. sc. Matee Nikolac Perković, znanstvene suradnice IRB-a, te prof. dr. sc. Karmele Barišić sa Zavoda za medicinsku biokemiju i hematologiju na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu u Zagrebu.

*Ovim putem zahvaljujem se obitelji na bezgraničnoj podršci i mentoricama na trudu, strpljenju i prenesenom znanju.*

Diplomski je rad izrađen u sklopu projekta IP-2019-04-6100, financiranog od strane Hrvatske zaklade za znanost, te u sklopu projekta J3-9293, financiranog od strane Slovenske agencije za znanost. Rad je predan na ocjenu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, radi stjecanja naziva zvanja magistra medicinske biokemije i laboratorijske medicine.

## SADRŽAJ

1.	UVOD .....	1
1.1.	Alzheimerova bolest.....	1
1.1.1.	Patofiziologija Alzheimerove bolesti .....	2
1.1.2.	Klinički stadiji .....	5
1.1.3.	Klasifikacija .....	6
1.1.4.	Čimbenici rizika .....	7
1.1.5.	Dijagnostički kriteriji .....	7
1.1.6.	Biljezi .....	9
1.1.7.	Terapijski pristup.....	11
1.2.	Moždani neurotrofni čimbenik .....	12
1.2.1.	Signalni putevi moždanog neurotrofnog čimbenika .....	14
1.2.2.	Moždani neurotrofni čimbenik u kontekstu Alzheimerove bolesti.....	16
1.2.3.	Klinički potencijal.....	18
2.	OBRAZLOŽENJE TEME .....	21
3.	MATERIJALI I METODE .....	22
3.1.	Ispitanici .....	22
3.2.	Obrada uzoraka krvi .....	22
3.3.	Izolacija ukupne RNA iz periferne krvi .....	23
3.4.	Određivanje koncentracije izolirane RNA .....	24
3.5.	Reverzna transkripcija izolirane RNA u komplementarnu DNA.....	24
3.6.	Određivanje ekspresije gena za protein BDNF .....	25
3.6.1.	Kvantifikacija genske ekspresije $\Delta\Delta C_t$ metodom.....	27
3.7.	Izolacija genomske DNA iz krvi .....	28
3.8.	Genotipizacija polimorfizama gena za moždani neurotrofni čimbenik.....	29
3.9.	Određivanje koncentracije moždanog neurotrofnog čimbenika u plazmi.....	32
3.10.	Statistička obrada podataka.....	35
4.	REZULTATI.....	37
4.1.	Demografski podaci.....	37
4.2.	Koncentracija moždanog neurotrofnog čimbenika u plazmi.....	38
4.2.1.	Usporedba koncentracije moždanog neurotrofnog čimbenika u plazmi između ispitanika oboljelih od Alzheimerove bolesti ili blagog kognitivnog (spoznajnog) poremećaja .....	40
4.2.2.	Povezanost koncentracije moždanog neurotrofnog čimbenika u plazmi s kognitivnim simptomima demencije .....	40

4.3.	Ekspresija gena za moždani neurotrofni čimbenik.....	42
4.3.1.	Usporedba relativne ekspresija gena za moždani neurotrofni čimbenik između ispitanika oboljelih od Alzheimerove bolesti (AB) ili blagog kognitivnog (spoznajnog) poremećaja (MCI) .....	43
4.3.2.	Povezanost relativne ekspresija gena za moždani neurotrofni čimbenik s kognitivnim simptomima demencije .....	44
4.4.	Povezanost koncentracije moždanog neurotrofnog čimbenika u plazmi s relativnom ekspresijom gena za moždani neurotrofni čimbenik.....	46
4.5.	Polimorfizmi gena za moždani neurotrofni čimbenik .....	46
4.5.1.	Povezanost polimorfizma rs6265 gena za moždani neurotrofni čimbenik s dijagnozom Alzheimerove bolesti.....	48
4.5.2.	Povezanost polimorfizma rs56164415 gena za moždani neurotrofni čimbenik s dijagnozom Alzheimerove bolesti.....	50
4.5.3.	Polimorfizmi gena za moždani neurotrofni čimbenik i kognitivni simptomi demencije .....	52
4.6.	Povezanost polimorfizama gena za moždani neurotrofni čimbenik s koncentracijom moždanog neurotrofnog čimbenika u plazmi.....	53
4.7.	Povezanost polimorfizama gena za moždani neurotrofni čimbenik s relativnom ekspresijom gena za moždani neurotrofni čimbenik.....	54
5.	RASPRAVA.....	56
6.	ZAKLJUČCI .....	63
7.	POPIS KRATICA .....	64
8.	LITERATURA.....	68
9.	SAŽETAK/SUMMARY .....	81
9.1.	SAŽETAK.....	81
9.2.	SUMMARY.....	82
10.	TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA .....	83

## 1. UVOD

### 1.1. Alzheimerova bolest

Alzheimerova bolest (AB) progresivni je neurodegenerativni poremećaj središnjeg živčanog sustava (SŽS), obilježen gubitkom kognitivnih sposobnosti, bihevioralnim i psihološkim ispadima te specifičnim patohistološkim nalazima. Najčešćim je uzrokom demencije, koju se može definirati kao sindrom, odnosno skup simptoma, uzrokovan organskom bolesti SŽS-a kojeg karakterizira globalno i progresivno oštećenje kognitivnih sposobnosti pri očuvanoj svijesti, a koji dovodi do nemogućnosti obavljanja svakodnevnih obaveza i ovisnosti o skrbi drugih osoba (WHO, 2021). Sindrom demencije je među najvažnijim javnozdravstvenim problemima današnjice s 55,2 milijuna oboljelih u svijetu prema podacima iz 2019. godine, a procjenjuje se da će taj broj narasti na 78 milijuna oboljelih 2030., odnosno 139 milijuna 2050. godine (WHO, 2021). Demencije se dalje mogu podijeliti prema kliničkoj slici (kortikalne, subkortikalne, progresivne) i prema uzroku (primarne, sekundarne). Primarne demencije su daleko češće od sekundarnih.

Povezanost starije životne dobi i demencije poznata je od antičkih vremena, međutim, histopatološke promjene karakteristične za AB prvi put su opisane 1906. godine, kada je njemački liječnik Alois Alzheimer na stručnom skupu predstavio “neobičan slučaj progresivne bolesti cerebralnog korteksa” zabilježen kod 50-godišnje žene liječene zbog paranoje, progresivnog poremećaja sna i pamćenja, agresivnosti i konfuzije. Bolesnica je preminula pet godina nakon početka praćenja, a histološki preparati moždanog tkiva pokazali su karakteristične senilne plakove i neurofibrilarne snopove (Hippius i sur., 2003).

Progresija bolesti odvija se kroz nekoliko stadija, od pretkliničkog oblika kada simptomi još nisu prisutni do onesposobljenosti koja dovodi do izdvajanja oboljele osobe iz ustaljenih obrazaca funkcioniranja i nemogućnosti obavljanja svakodnevnih zadataka. Nastavno na to, oboljelima je potrebna svakodnevna zdravstvena i socijalna skrb, koja je u velikom dijelu prepuštena obitelji i bliskim, mahom ženskim, osobama. Socioekonomske prilike jasno pokazuju razlike u infrastrukturi i dostupnosti odgovarajuće skrbi u razvijenijim i manje razvijenim državama te utjecaj bolesti na mikrozajednicu oboljelih pojedinaca u vidu medicinskih i ne-medicinskih troškova liječenja i skrbi, gubitka radne sposobnosti te utjecaja bolesti na primarnog njegovatelja (financijski, socijalni i psihološki stress) (WHO, 2021).

Prema multicentričnom istraživanju Fratiglioni i sur., AB je odgovorna za 60 – 70 % slučajeva demencija u Europi, vaskularna demencija za 15 – 20 %, a ostale demencije za 10 – 25 % (npr. bolest Lewyjevih tjelešaca, demencija u Parkinsonovoj bolesti, itd.) (Fratiglioni i sur., 2000). Uzimajući u obzir globalne trendove dobne raspodjele stanovništva, za očekivati je da će oboljelih od sindroma demencije biti sve više, posebice u mnogoljudnim zemljama i među ženama, koje prosječno žive dulje od muškaraca.

U Republici Hrvatskoj (RH) trenutno ne postoji registar oboljelih od Alzheimerove bolesti, ali prema procjeni Međunarodnog udruženja za Alzheimerovu bolest (engl. *Alzheimer's Disease International*, ADI) i Europskog udruženja za AB (engl. *Alzheimer Europe*), na temelju podataka popisa stanovništva iz 2011. godine, u RH je tada od demencije bolovalo 80 864 osoba (1,89 % stanovništva) (Mimica i sur., 2015). Međutim, u skladu s globalnim akcijskim planom Svjetske zdravstvene organizacije (SZO) (WHO, 2021), donesen je prijedlog nacрта Hrvatske strategije borbe protiv Alzheimerove bolesti i drugih demencija (Mimica i sur., 2015), a koji navodi tri prioriteta:

- a) rana dijagnoza bolesti
- b) dostupnost liječenja antidementivima
- c) uspostava koordiniranog sustava potpore osobama koje boluju od Alzheimerove bolesti, njihovim obiteljima i njegovateljima u svrhu podizanja kvaliteta njihova liječenje i zbrinjavanja.

Implementacija nacionalne strategije značila bi profesionalni i zakonodavstveni temelj za sustavno rješavanje problematike AB-a, a razvojem novih terapijskih mogućnosti, koje bi utjecale na tijek bolesti ili sprječavanje njenog nastanka, te biljega koji bi omogućili rano otkrivanje i intervenciju, fokus liječenja pomaknuo bi se s trenutnog upravljanja prisutnim simptomima na prevenciju i izlječenje.

#### 1.1.1. Patofiziologija Alzheimerove bolesti

Neurobiološke promjene karakteristične za AB nastupaju vrlo rano u odnosu na vrijeme ispoljavanja kliničkih simptoma. Pojava senilnih amiloidnih plakova i neurofibrilarnih snopića tau proteina može desetljećima prethoditi strukturalnim promjenama mozga, poput gubitka volumena hipokampusa i smanjenog metabolizma glukoze. Prema istraživanju Batemana i sur., koncentracije  $A\beta_{42}$  u likvoru opadaju 25 godina prije, amiloidni plakovi se pojavljuju 15 godina

prije, a cerebralni hipometabolizam i narušeno pamćenje 10 godina prije očekivane pojave simptoma AB-a. U navedenom istraživanju sudjelovalo je 128 bolesnika iz obitelji s nasljednim oblikom AB-a, a vrijeme očekivane pojave simptoma određeno je prema tijeku bolesti kod roditelja (Bateman i sur., 2012).

Nekoliko je hipoteza nastanka AB-a. Među glavne se ubrajaju tau-hipoteza, amiloidna hipoteza, kolinergička hipoteza, upalna hipoteza, hipoteza oksidacijskog stresa te vaskularna hipoteza.

Tau-hipoteza se odnosi na intracelularno nakupljanje neurofibrilarnih snopića izgrađenih od hiperfosforiliranog tau proteina. Takvi su snopići karakteristični histološki nalaz u AB-u. Tau proteini pripadaju obitelji proteina koji vežu mikrotubule i njihova je glavna funkcija stabilizacija mikrotubula, koji su okosnica unutarstaničnog transporta. Agregacija tau proteina je progresivna i dovodi do depolimerizacije mikrotubula, narušenog provođenja signala unutar i između neurona, i neurotoksičnosti (Liu i sur., 2019). Tau sadrži nekoliko serinskih i treoninskih aminokiselinskih ostataka koji mogu biti fosforilirani, a regulacija fosforilacije ovisi o aktivnosti pripadajućih kinaza i fosfataza. Druge posttranslacijske modifikacije također mogu utjecati na stupanj fosforilacije, npr. O-glikozilacija serina i treonina djeluje negativno na razinu hiperfosforilacije i time hiperfosforilacija može biti posljedica smanjene O-glikozilacije (Liu i sur., 2019).

Amiloidna hipoteza u glavnu ulogu stavlja amiloid- $\beta$  ( $A\beta$ ) – peptid normalno prisutan u stanici, ali čiji su razina i metabolizam promijenjeni u AB-u. Peptid  $A\beta$  nastaje iz prekursora proteina  $A\beta$  (engl. *amyloid-beta precursor protein*, APP) koji se proteolitički cijepa na dva načina (Malnar i sur., 2009):

- $\alpha$ -put u kojem APP hidrolizira enzim  $\alpha$ -sekretaza, a zatim  $\gamma$ -sekretaza, i kojim ne nastaje netopljivi  $A\beta$  (neamiloidogeni put)
- $\beta$ -put u kojem APP hidrolizira enzim  $\beta$ -sekretaza, a zatim  $\gamma$ -sekretaza, i kojim nastaje netopljivi  $A\beta$  (amiloidogeni put).

Cijepanjem APP-a nastaju peptidi  $A\beta$  različitih duljina, a najznačajniji su  $A\beta_{40}$  i  $A\beta_{42}$ . Amiloidni plakovi većinom su izgrađeni od  $A\beta_{42}$ . Praćenjem omjera  $A\beta_{42}/A\beta_{40}$  može se pratiti progresija u ranim fazama bolesti jer se, nakon inicijalnog porasta razine  $A\beta_{42}$  u oboljelih osoba, ona smanjuje odlaganjem  $A\beta_{42}$  u amiloidne plakove (Perez-Grijalba i sur., 2019). U stanici je u normalnim uvjetima preferiran  $\alpha$ -put cijepanja APP-a gdje ne dolazi do nakupljanja



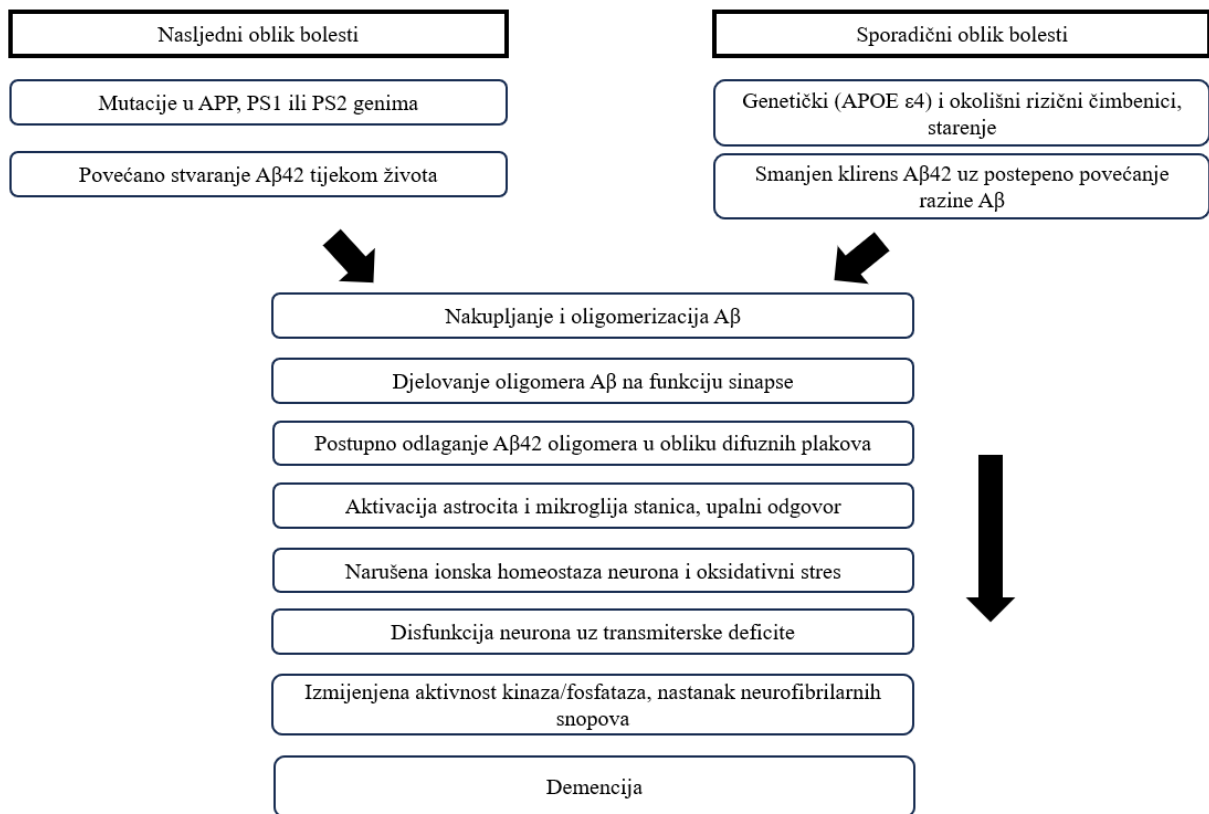
netopljivog A $\beta$ . Međutim, u slučaju mutacija u okolini mjesta prepoznavanja enzima  $\beta$ -sekretaze, dolazim do preusmjerenja hidrolize na  $\beta$ -put i stvaranja nakupina netopljivog A $\beta$  koji je neurotoksičan. Navedeni događaj se smatra primarnim u kaskadi neurodegeneracije i nastanka AB-a, a sinteza inhibitora enzima uključenih u  $\beta$ -put jedna je od strategija razvoja novih terapijskih opcija (Malnar i sur., 2009).

Kolinergička hipoteza u obzir uzima aktivnost enzima koji sudjeluju u sintezi neurotransmitera, prije svega acetilkolina. Sintezu acetilkolina katalizira kolin acetiltransferaza i njena aktivnost je značajno snižena u amigdali, hipokampusu i korteksu oboljelih od AB-a, uz sniženu razinu acetilkolina u sinapsama (Ferreira-Viera i sur., 2016). Upravo s idejom povećanja razine acetilkolina razvijeni su prvi lijekovi odobreni za korištenje u indikaciji AB-a, tzv. inhibitori acetilkolinesteraze, koji djeluju tako da inhibiraju razgradnju acetilkolina.

Upalna hipoteza se odnosi na pojačan proupalni odgovor mikroglija stanica i astrocita u SŽS-u oboljelih od AB-a. Upalna hipoteza i amiloidna hipoteza su u međugri. Peptid A $\beta$  ima ključnu ulogu u aktivaciji mikroglija stanica na koje se veže putem CD36-TLR4-TLR6 receptorskog kompleksa i NLRP3 inflammasoma (Liu i sur., 2019), te na taj način potiče sintezu proupalnih citokina. Međutim, terapijski učinak protuupalnih lijekova u ovom kontekstu je ograničen i kliničke studije nisu dale ohrabrujuće rezultate.

Oksidacijski stres za stanicu znači pretjerano stvaranje reaktivnih kisikovih vrsta ili smanjen kapacitet za njihovo uklanjanje i usko je povezan s funkcijom mitohondrija, gdje se odvija oksidativni metabolizam. Prije pojave kliničkih simptoma AB-a, pokazano je povećano stvaranje reaktivnih kisikovih vrsta te oštećenje i smanjen broj intaktnih mitohondrija (Liu i sur., 2019). Moždana vaskulatura posebno je osjetljiva na stanični stres koji može dovesti do kronične hipoperfuzije i narušavanja nepropusnosti krvno-moždane barijere (Scheffer i sur., 2021), strukture od kritične važnosti za homeostazu mozga.

Točan tijek patogeneze AB-a još nije razjašnjen, ali smatra se da središnju ulogu ima taloženje netopljivog A $\beta$  koji pridonosi oksidativnom staničnom stresu i disfunkciji mitohondrija, tauopatologiji i propadanju sinapsi. Slijed događaja koji su uključeni u razvoj AB sažeto prikazuje [Slika 1.](#)



**Slika 1.** Sažeti prikaz hipoteze amiloidne kaskade. Prilagođeno prema Blennow i sur., 2006.

### 1.1.2. Klinički stadiji

Sam tijek bolesti može se podijeliti u nekoliko stadija – pretklinički, blagi kognitivni (spoznajni) poremećaj (engl. *mild cognitive impairment*, MCI) te AB koja može biti blagog, umjerenog i teškog oblika. AB je progresivna i neizlječiva, tako da se odmicanjem vremena uz bolesnika veže sve teža klinička slika.

U pretkliničkom stadiju nisu ispoljeni klinički simptomi, ali prisutne su patohistološke promjene karakteristične za bolest. Nacionalni institut za starenje Sjedinjenih Američki Država i Udruženje za Alzheimerovu bolest (engl. *National Institute on Aging and Alzheimer's Association*, NIA-AA) u zajedničkim smjernicama (Sperling i sur., 2011) pretklinički stadij dijeli na faze koje se mogu razlikovati ovisno o prisutnosti biljega koji upućuju na patološke promjene karakteristične za AB u bolesnika koji još ne zadovoljavaju kriterije blagog kognitivnog deficita. Faza 1 odgovara asimptomatskoj cerebralnoj amiloidozii, faza 2 taloženju

amiloida uz narušenu funkciju sinapsi i/ili ranu neurodegeneraciju, a faza 3 taloženju amiloida uz prisutnost neurodegeneracije (Tan i sur., 2014).

MCI je stadij koji prethodi AB-u, kada objektivno prisutne kognitivne smetnje još ne remete svakodnevne aktivnosti u značajnoj mjeri. U petom izdanju Dijagnostičkog i statističkog priručnika mentalnih poremećaja (engl. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*, DSM) opisan je kao blagi neurokognitivni poremećaj (engl. *minor neurocognitive disorder*, mNCD) (Sachs-Ericsson i Blazer, 2015). Zahvaćeni imaju povećan rizik od razvoja demencije i oko 15 % ih godišnje progredira u demeciju (Sošić i sur, 2018).

Nadalje, za rani stadij AB-a karakteristični su gubitak kratkotrajnog pamćenja i teško usvajanje novih sadržaja te narušena sposobnost organizacije svakodnevnih aktivnosti (Mimica i Presečki, 2012). Također se mogu pojaviti oscilacije raspoloženja i promjene crta ličnosti, ali dugotrajno pamćenje i prilagođenost u društvu nisu značajno narušeni (Mimica i Presečki 2012). U srednjem stadiju simptomi eskaliraju te postaje zahvaćeno i dugoročno pamćenje uz narušene sposobnosti komunikacije, prepoznavanja i orijentacije, gubitak kontrole nad emocijama i pojavu psihološka oboljenja, te zanemarivanje osobne higijene (Mimica i Presečki, 2012). Kasni stadij obilježen je teškim kognitivnim propadanjem i potpunom onesposobljenosti bolesnika. U kasnom stadiju bolesnik je u potpunosti ovisan o skrbi drugih osoba i potrebna mu je cjelodnevna zdravstvena njega. Smrt obično nastupa četiri do šest godina nakon dijagnoze, a najčešće je posljedica infekcije (Yaari i Corey-Bloom, 2007).

### 1.1.3. Klasifikacija

Prema utjecaju nasljedne komponente, AB se dijeli na nasljedni i sporadični tip. Nasljedni tip AB-a se javlja kod više osoba unutar obitelji, ima izraženu genetičku podlogu te se češće javlja u ranijoj životnoj dobi. Prenosi se autosomno dominantnim obrascem nasljeđivanja. Sporadični tip AB-a se javlja bez prethodno zabilježenih slučajeva oboljenja od AB-a unutar iste obitelji i u kasnijoj životnoj dobi u odnosu na nasljedni tip. Sporadični tip je daleko češći od nasljednog, koji čini 1 – 5 % dijagnosticiranih slučajeva (Bateman i sur., 2011). Nasljedni tip AB-a naziva se još i AB s ranim nastupom (prije 65. god.), a sporadični tip, AB s kasnim nastupom (nakon 65. god.), ovisno o dobi bolesnika u trenutku prezentacije simptoma.

#### 1.1.4. Čimbenici rizika

Jednoznačni uzrok pojave AB-a nije definiran. Smatra se da nastaje uslijed kombinacije genetičkih i okolišnih čimbenika. Čimbenici rizika mogu se podijeliti na nepromjenjive, promjenjive i potencijalno promjenjive. Dob je najsnažniji poznati čimbenik rizika za gubitak kognitivnih sposobnost, ali demencija ne mora biti neizbježna posljedica starenja. Lancetov Odbor za prevenciju, intervenciju i zbrinjavanje demencije objavio je 2020. godine izvješće u kojem tvrdi da je za oko 40 % slučajeva demencije, uključujući AB, odgovorno 12 potencijalno promjenjivih čimbenika rizika: niža razina obrazovanja, hipertenzija, narušen sluh, pušenje, pretilost, depresija, tjelesna neaktivnost, dijabetes, manjak društvenog kontakta, prekomjerna konzumacija alkohola, traumatska ozljeda mozga i onečišćenje zraka (Livingston i sur., 2020). Bitno je napomenuti da se navedeni čimbenici rizika mogu neproporcionalno odnositi na marginalizirane skupine i ekonomski manje razvijene dijelove svijeta te na taj način značajno povećati rizik od oboljenja za određene zajednice. Globalni akcijski plan i nacionalne strategije mogu utjecati na promjenjive čimbenike rizika, ranu dijagnozu, pravovremeni početak liječenja, te dostupnost i kvalitetu skrbi.

S druge strane, genetski čimbenici rizika su nepromjenjivi. Uz nasljedni oblik bolesti vežu se mutacije u genu za APP, te mutacije u genima za presenilin 1 (PS1) i presenilin 2 (PS2) (Malnar i sur., 2009). PS1 i PS2 dio su membranskog kompleksa  $\gamma$ -sekretaze, enzima koji sudjeluje u cijepanju APP-a do A $\beta$ . Jedini utvrđen rizični čimbenik za razvoj sporadičnog oblika bolesti je polimorfizam  $\epsilon$ 4 gena za apolipoprotein E (ApoE4). Heterozigoti za navedeni alel imaju 3 puta veći rizik, a homozigoti 15 puta veći rizik od nastanka bolesti (Farrer i sur., 1997). Geni povezani s moždanim neurotrofnim čimbenikom (engl. *brain-derived neurotrophic factor*, BDNF), katehol-O-metiltransferazom (engl. *catechol-O-methyltransferase*, COMT), serotoninским transporterom, dopaminergičkim receptorima, te genima uključenim u oksidativni stres i upalni odgovor također se proučavaju u kontekstu AB-a (Borroni i sur., 2010; Serretti i sur., 2007).

#### 1.1.5. Dijagnostički kriteriji

Važnost ranog postavljanja dijagnoze demencije istaknuta je u Globalnom akcijskom planu za demenciju SZO-a, a kao cilj postavljena je dijagnostička stopa od barem 50 % u najmanje 50 % država sudionica (WHO, 2021). Međutim, stvarne prijavljivanje stope su daleko niže od

željenih, bilo zbog ograničenog pristupa dijagnostičkim alatima, nepostojanja nacionalne strategije i nacionalnih registara ili zbog socio-ekonomskih prepreka.

U određenom trenutku bolest može biti suspektna, vjerojatna ili potvrđena, a tri su međunarodno prihvaćena klinička kriterija za postavljanje dijagnoze AB-a: DSM-5, Međunarodna klasifikacija bolesti, 11. izdanje (MKB-11), i NIA-AA. Sva tri kriterija zahtijevaju isključenje drugih potencijalnih uzroka demencije, progresivan i postupan tijek bolesti, te da se kognitivnih deficiti ne pojavljuju isključivo za vrijeme trajanja delirija.

Kao dokaz kognitivnog propadanja prihvaća se izraz zabrinutosti samog bolesnika, upućene osobe ili kliničara. Značajno kognitivno propadanje preferirano se bilježi standardiziranim neuropsihološkim testovima, odnosno drugom primjerenom kliničkom procjenom. U usporedbi s prethodnim verzijama navedenog priručnika, ažurirane su i proširene kognitivne domene tako da uključuju društvenu kogniciju i kompleksnu pažnju te je tako pažnja pomaknuta isključivo sa smetnji pamćenja (Sošić i sur., 2018).

Alati dostupni kliničarima uključuju anamnezu bolesnika, fizikalni i neurološki pregled, psihometrijsko testiranje, razne slikovne tehnike, biljege te patohistološku analizu *post mortem*. Najčešće korišteni psihometrijski testovi su Mini-mental test (engl. *Mini Mental State Examination*, MMSE), Montrealska ljestvica procjene kognitivnih sposobnosti (engl. *Montreal Cognitive Assessment*, MoCA), Mini-Cog kratki test probira te neuropsihologijsko testiranje kao opsežna evaluacija više kognitivnih domena (Sošić i sur., 2018). MMSE se u praksi najčešće koristi za procjenu kognitivnih sposobnosti u dijagnozi demencije, a sastoji se od različitih pitanja koja se boduju s nula bodova ili jednim bodom (Cockrell i Folstein, 1988; Folstein i sur., 1975). Uključuje procjenu budnosti, pažnje, razumijevanja, imenovanja i ponavljanja, čitanja i pisanja, računanja, orijentacije, memorije, te diskriminacije lijevo-desno. Maksimalan broj bodova koji se može postići je 30, a veći broj bodova povezuje se s boljim kognitivnim sposobnostima. Test crtanja sata (engl. *clock drawing test*, CDT) (Sunderland i sur., 1989) se također koristi za procjenu uznapredovalosti demencije, a tijekom bodovanja ocjenjuje se crtanje kruga (1 bod), brojeva (2 boda) i kazaljki s točnim vremenom (2 boda). Maksimalan broj bodova je 5 i on upućuje na odsustvo kognitivnih deficita. Ukoliko osoba na testu ostvari manji broj bodova od maksimalnog, upućuje se na daljnju obradu.

Slikovne tehnike omogućavaju procjenu atrofije određenih područja mozga te eventualnih komorbidnih stanja, a moguće je i praćenje progresije MCI-ja u AB. Na primjer, strukturalna magnetna rezonancija (MR) se koristi za procjenu mediotemporalne atrofije, volumetrijski MR za gubitak volumena hipokampusa i entorinalnog korteksa, a pozitronska emisijska tomografija s fluorodeoksiglukozom (FDG-PET) za procjenu smanjenog metabolizma glukoze u temporoparijetalnom režnju i hipokampalnom području što korelira s težinom kognitivnog oštećenja (Mimica i Presečki, 2012).

#### 1.1.6. Biljezi

Važnost biljega leži u njihovoj potencijalnoj ulozi u ranom i neinvazivnom otkrivanju bolesti. U kombinaciji s ostalim navedenim alatima, dobar biljeg omogućio bi razlikovanje pojedinih oblika demencije, ranije otkrivanje bolesti i terapijsku intervenciju, a time usporavanje progresije bolesti i bolje ishode. Karakteristike koje dobar biljeg mora imati jesu specifičnost, osjetljivost, korelacija s kliničkom slikom, ne-invazivnost uzrokovanja, jednostavna i ekonomski prihvatljiva metodologija određivanja, te dostupnost.

Standardna laboratorijska obrada bolesnika sa sumnjom na demenciju započinje diferencijalno-dijagnostičkim postupkom koji se sastoji od nespecifičnih pretraga kojima se isključuju anemija, hipotiroidizam, manjak vitamina B12, šećerna bolest te bolesti jetre i bubrega, a MR-om ili CT-om bez kontrasta se isključuju stanja poput moždanog udara, subduralnog hematoma, normotenzivnog hidrocefalusa ili tumorske tvorevine (Falk i sur., 2018). Ukoliko postoji osnovana sumnja, mogu se napraviti testovi specifični za uzročnike nekih infektivnih bolesti poput virusa humane imunodeficijencije ili sifilisa (Falk i sur., 2018).

Biljezi u likvoru daju uvid u specifične patološke promjene u mozgu, A $\beta$  peptidi u stvaranje amiloidnih plakova, a ukupni ili fosforilirani tau proteini u neuronalnu degeneraciju. U kontekstu Alzheimerove bolesti, očekuje se snižena koncentracija A $\beta$ <sub>42</sub> i povišena koncentracija ukupnog ili fosforiliranog tau proteina (Mimica i Presečki, 2012). Mjerenje biljega u likvoru i A $\beta$  PET, zajedno sa sveobuhvatnom fizikalnim i neuropsihološkim pregledom, objektivni su dokazi patologije Alzheimerove bolesti, međutim još nisu zaživjeli u rutinskoj kliničkoj praksi osim u specijaliziranim „*Memory*“ centrima u Europi u svijetu. Uvođenje mjerenja biljega u likvoru u rutinsku dijagnostiku demencija danas se snažno preporučuje (Sošić i sur., 2018).

Glavni problem analize biljega u likvoru jest invazivnost postupka uzorkovanja. Najčešće prijavljivane nuspojave su bol u leđima i glavobolja. Međutim, postoje preporuke kojima se rizik od neželjenih učinaka može minimizirati, a koje uključuju korištenje slikovnih tehnika prije uzorkovanja kako bi se isključile kontraindikacije, provjeru koagulacijskog statusa i broja trombocita te profiliranje bolesnika. Čimbenici rizika vezani uz bolesnika su mlađa dob (jače izraženo kod žena <40 godina starosti), povijest glavobolja te strah od komplikacija nakon lumbalne punkcije (Engelborghs i sur., 2017).

S druge strane, u tijeku je razdoblje intenzivnog rada na pomicanju s likvora kao izvora biljega na periferne biljege demencije koji bi omogućili neinvazivno, lako dostupno i ekonomski prihvatljivije testiranje. Obecavajući biljezi u krvi obuhvaćaju mjerenje A $\beta$  peptida (masenom spektrometrijom ili imunokemijskim metodama), fosforilirani tau (p-tau) ili ukupni tau (t-tau), glijalni fibrilarni kiseli protein (engl. *glial fibrillary acidic protein*, GFAP) kao biljeg reaktivne astroglioze te laki lanac neurofilamenta (engl. *neurofilament light chain*, NfL) kao biljeg neurodegeneracije, ali manje specifičan za AB (Mankhong i sur., 2022).

Genetički su biljezi također predmet brojnih istraživanja. APOE  $\epsilon$ 4 alel je potvrđeni genetički čimbenik rizika za razvoj AB-a i djeluje kao modulator između plazmatskog A $\beta$  i amiloidnih plakova u mozgu (Mankhong i sur., 2022).. Prisutnost  $\epsilon$ 2 alela djeluje protektivno na razvoj bolesti, a  $\epsilon$ 3 alel je neutralan (Mankhong i sur., 2022). Osim navedenog, varijante u genima *ABCA7*, *BINI*, *CD33*, *CLU*, *CRI*, *EPHA1*, *PICALM* i *TREM2* povezane su s progresijom AB-a, međutim njihova točna uloga i mehanizam još nisu razjašnjeni (Mankhong i sur., 2022).

Ostali biljezi u istraživanju uključuju cirkulirajuće egzosome neuronalnog podrijetla, odnosno njihov sadržaj (mRNA, proteini, miRNA i lipidi), ali put do potencijalnog kliničkog biljega je dalek, uz izraženi problem standardizacije metodologije. miR-125b, miR-455-3p, and miR-501-3 pokazale su potencijal razlikovanja oboljelih od AB-a i zdravih ispitanika s visokom osjetljivošću i specifičnošću, ali povezane su i s drugim patološkim stanjima poput raka, te su potrebna daljnja longitudinalna istraživanja za ispitivanje kliničke korisnosti (Mankhong i sur., 2022). Nadalje, omjerom fosfatidilkolina i lizofosfatidilkolina u plazmi moguće je razlikovati AB i MCI od zdravih kontrola, ali istraživanja koja se bave promjenama metabolizma lipida u ovom kontekstu su tek u začetku (Mankhong i sur., 2022).

### 1.1.7. Terapijski pristup

Pristup liječenju oboljelih od AB-a slojevit je, kompleksan i nužno individualno orijentiran. Osim na samog bolesnika, bolest utječe i na njemu bliske osobe, i potrebno je definirati multidisciplinarnu matricu skrbi u kojoj će bolesnik biti zbrinut na adekvatan i razumljiv način. Takav plan skrbi se sastoji od nefarmakoloških i farmakoloških metoda liječenja. Nefarmakološke mjere uključuju socijalnu podršku poput specijaliziranih domova i dnevnih boravaka, savjetovališta za oboljele i njima bliske osobe te palijativnu skrb (Mimica i Presečki, 2012). Za zbrinjavanje bihevioralnih i psiholoških simptoma, pokazale su se korisnim i alternativne terapije poput kućnih ljubimaca, aromaterapije te terapije svjetlom i glazbom (Hersch i Falzgraf, 2007).

Sadašnje farmakološko liječenje AB-a temelji se na ublažavanju simptoma bolesti antidementivima ili psihofarmacima. Prva skupina lijekova razvijena za liječenje demencije su inhibitori acetilkolinesteraze koji djeluju tako da sprječavaju razgradnju acetilkolina na kolin i acetat, te time produljuju njegov učinak. Primarno djeluju na kognitivne simptome demencije poput poteškoća u učenju i pamćenju. U kliničkoj praksi su donepezil, galantamin i rivastigmin, a upotreba takrina je gotovo napuštena. Osim inhibitora acetilkolinesteraze, u primjeni je i memantin, nekompetitivni antagonist receptora za N-metil-D-aspartat (NMDA), koji djeluje neuroprotektivno regulirajući razinu glutamata. Kombiniranim liječenjem memantinom i jednim od inhibitora acetilkolinesteraze postignuti su bolji rezultati u odnosu na monoterapiju inhibitorima acetilkolinesteraze.

Hrvatski algoritam za farmakološko liječenje oboljelih od AB-a kao prvi izbor u liječenju blagog i umjerenog oblika bolesti navodi donepezil. Ukoliko izostane odgovarajući učinak donepezila, kao drugi izbor uvode se rivastigmin ili galantamin, a kao treća opcija može se uvesti memantin (Mimica i Presečki, 2012). Za liječenje umjerenog do teškog oblika bolesti kao terapija izbora navodi se kombinacija memantina i donepezila, odnosno memantin uz rivastigmin ili galantamin u slučaju izostanka odgovora na donepezil (Mimica i Presečki, 2012).

Osim kognitivnih simptoma, liječenje demencije može zahtijevati i zbrinjavanje psihijatrijskih simptoma, poremećaja u ponašanju i nesanice pa se u tu svrhu često u terapiji nalaze anksiolitici, antidepresivi, antipsihotici, sedativi i slični lijekovi, čime se dodatno komplicira



farmakoterapija oboljelih, pogotovo starije životne dobi, kada je potrebno obratiti posebnu pažnju na adherenciju, doziranje i interakcije među lijekovima.

Strategije u razvoju uključuju inhibitore  $\beta$ -sekretaze i  $\gamma$ -sekretaze koji sprječavaju razgradnju APP na peptidne fragmente amiloidnih plakova, antiagregacijske lijekove poput kelatora metala koji inhibiraju taloženje A $\beta$ , lijekove koji utječu na aktivnost proteaza uključenih u razgradnju A $\beta$ , te imunoterapijske opcije poput protutijela na A $\beta$  ili tau proteine (Liu i sur., 2019). Nadalje, u klinička ispitivanja uključeni su mnogi prenamijenjeni lijekovi iz područja metabolički bolesti poput metformina, gemfibrozila, roziglitazona, simvastatina i GLP-1 agonista (semaglutid, liraglutid) te raznih upalnih stanja poput indometacina, celekoksiba i etanercepta (Liu i sur., 2019; Du i sur., 2022; Penke i sur., 2023).

Adakanumab (Aduhelm; Biogen, Eisai i Neurimmune) i lekanemab (Leqembi; Eisai i Biogen) su dvije imunoterapije usmjerene na A $\beta$ , odobrene ubrzanim postupkom od strane Agencije za hranu i lijekove SAD-a za liječenje ranog oblika AB-a (Cummings i sur., 2023). Međutim, niti jedno od navedenih protutijela nije dobilo odobrenje Europske agencije za lijekove na temelju dosadašnjih dokaza.

## 1.2. Moždani neurotrofni čimbenik

BDNF pripada obitelji neurotrofina, čimbenika rasta koji reguliraju razvoj, preživljavanje i funkciju neurona. Osim njega, u toj skupini nalaze se još čimbenik rasta živaca (engl. *nerve growth factor*, NGF), neurotrofin-3 (NT3) i neurotrofin-4 (NT4) (Lewin i Carter, 2014). U svom zreлом obliku, to su nekovalentno povezani dimeri, a svaka podjedinica neurotrofina sastoji se od dva para anti-paralelnih  $\beta$ -ploča stabiliziranih disulfidnim mostovima koji čine strukturu nazvanu cisteinskim čvorom (engl. *cystine knot*), karakterističnu i za druge faktore rasta poput transformirajućeg čimbenika rasta  $\beta$  (engl. *transforming growth factor beta*, TGF- $\beta$ ) i čimbenika rasta trombocitnog porijekla (engl. *platelet-derived growth factor*, PDGF) (Lewin i Carter, 2014).

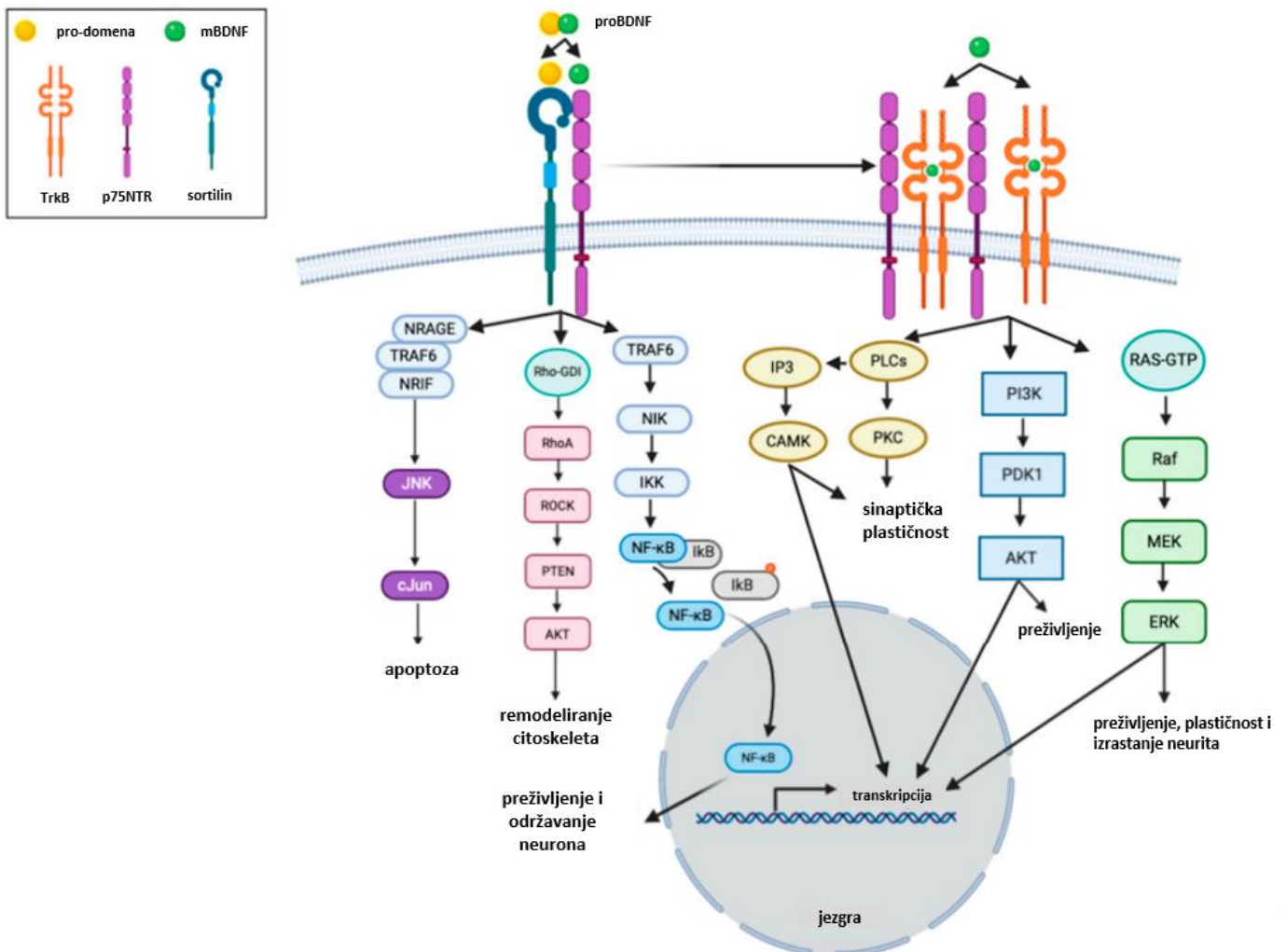
U usporedbi s ostalim neurotrofinima, BDNF je snažno eksprimiran i rasprostranjen u mozgu, posebice u regijama značajnim za razvoj AB-a, poput hipokampusu i cerebralnog korteksa. Njegova ekspresija fino je regulirana putem 9 funkcionalnih promotorskih mjesta za transkripcijske čimbenike te procesom alternativnog prekrajanja, te kao odgovor na različite

podražaje rezultira različitim transkriptima. Kvantitativnom analizom pokazano je da su pojedini *BDNF* transkripti specifično raspoređeni u hipotalamusu, prefrontalnom korteksu i hipokampusu (Maynard i sur., 2015). Epigenetičkim promjenama u strukturi kromatina također se može, ovisno o aktivnosti, regulirati transkripcija gena za *BDNF* (Gao i sur., 2022). Sam gen *BDNF* nalazi se na 11. kromosomu, sadrži 11 eksona i duljine je oko 70 kb (Pruunsild i sur., 2007). Ključni pozitivni regulator transkripcije *BDNF*-a su okolišni čimbenici koji ekscitiraju neurone, tj. povećavaju intracelularnu koncentraciju  $Ca^{2+}$ , a inhibitorni signali poput  $\gamma$ -aminomaslačne kiseline (engl.  *$\gamma$ -aminobutyric acid*, GABA) imaju suprotni učinak (Lewin i Carter, 2014). Transkripciju *BDNF*-a moguće je regulirati influksom  $Ca^{2+}$  jer on potiče vezanje transkripcijskih faktora CREB (engl. *cyclic AMP response element-binding protein*) i CaRF (engl. *calcium responsive transcription factor*) na promotore gena *BDNF* (Tao i sur., 2002). Smanjena ekspresija gena *BDNF* povezana je s nakupljanjem  $A\beta$  i stvaranjem amiloidnih plakova, tau fosforilacijom, odumiranjem neurona i upalom (Wang i sur., 2019). Osim uloge u rastu i razvoju neurona, također djeluje na sinaptičku plastičnost, prometovanje neurotransmitera, učenje i pamćenje (Huang i Reichardt, 2001; Russo-Neustadt, 2003).

Kao i ostali neurotrofini, *BDNF* se sintetizira kao prekursor sa signalnom sekvencom na N-terminalom kraju koja ga usmjerava u endoplazmatski retikulum (pre-pro-*BDNF*). Nakon uklanjanja signalnog slijeda, pro-*BDNF* putuje u Golgijev aparat gdje se odvija post-translacijska modifikacija, te unutar sekrecijskih vezikula odlazi prema ciljnim unutarstaničnim odjeljcima. Neurotrofini svoju funkciju ostvaruju djelovanjem na neurotrofinski receptor niskog afiniteta  $p75^{NTR}$  i tropomiozinske receptorske kinaze TrkA, TrkB i TrkC. Aktivacija ova dva tipa receptora ima suprotne učinke. Proneurotrofini djelovanjem na receptor  $p75^{NTR}$  potiču apoptozu, a zreli oblik proteina djelovanjem na receptor Trk potiču preživljenje stanice (Friedman, 2012). Ciljni receptor za zreli oblik *BDNF*-a (engl. *mature BDNF*, mBDNF) je TrkB.

### 1.2.1. Signalni putevi moždanog neurotrofnog čimbenika

Receptor TrkB pripada obitelji tirozinskih kinaznih receptora tipa I s izraženo glikoziliranom izvanstaničnom domenom koja sadrži tri ponavljajuće sekvencije bogate leucinima, dvije ponavljajuće sekvencije bogate cisteinima te imunoglobulinsku C2 domenu proksimalno od transmembranske regije, a unutarstanična domena ima tirozinsku kinaznu katalitičku aktivnost. Vežanjem liganda na izvanstaničnu domenu dolazi do dimerizacije i autofosforilacije receptora. BDNF vežanjem na TrkB receptore aktivira više nizvodnih signalnih puteva: signalni put kinaze regulirane izvanstaničnim signalom (engl. *extracellular signal-regulated kinase*, ERK) koja je član porodice proteinskih kinaza aktiviranih mitogenima (engl. *mitogen-activated protein kinase*, MAPK), signalni put fosfatidilinozitol-3-kinaze (engl. *phosphatidylinositol 3-kinase*, PI3K) te signalni put fosfolipaze C gama (engl. *phospholipase C gamma*, PLC $\gamma$ ). BDNF djelovanjem preko navedenih signalni putova utječe na rast, razvoj i morfologiju neurona, gustoću dendritičkih trnova, sinaptičku plastičnost, neurotransmisiju, učenje i pamćenje (Wang i sur., 2019; Gao i sur., 2022).



**Slika 2.** Shema signalizacije BDNF-a. Preuzeto i prilagođeno iz Colucci-D'Amato i sur. 2020.

[Slika 2](#) sažeto prikazuje signalne puteve BDNF-a. Nakon autofosforilacije tirozinskih aminokiselinskih ostataka na karboksilnom kraju kinazne domene, fosfotirozini funkcioniraju kao vezne domene za Src-homologe 2 (SH-2) domene adaptorskog proteina Grb-2. Grb-2 putem svojih SH-3 domena privlači Sos protein preko regije bogate prolinom. Sljedeći protein u nizu je Ras, mali G-protein, koji je važan za daljnje provođenje signala. G-proteini u neaktivnom obliku vežu gvanozin-difosfat (GDP), a njegovom zamjenom s gvanozin-trifosfatom (GTP) dolazi do promjene konformacije u aktivni oblik. Navedenu promjenu potiče ranije spomenuti Sos koji se još naziva i čimbenikom zamjene gvaninskih nukleotida (engl. *guanin nucleotide exchange factor*, GEF). U svom aktivnom obliku Ras, između ostalog, veže i protein-kinazu Raf koja također podliježe konformacijskoj promjeni i u aktivnom obliku fosforilira druge proteine. Raf može fosforilirati i aktivirati proteinsku kinazu MEK, koja će fosforilirati i aktivirati ERK. Supstrati ERK-a mnogobrojni su transkripcijski faktori i druge proteinske kinaze, a konačni učinak aktivacije ovog signalnog puta je transkripcija ciljnih gena važnih za preživljenje stanice.

Aktivirani protein Ras može djelovati i na signalni put PI3K. Aktivirana PI3K fosforilira membranski fosfolipid fosfatidilinzitol-4,5-bisfosfat (PIP2) čime nastaje fosfatidilinozitol-3,4,5-trifosfat (PIP3). Najvažniji korak u ovom signalnom slijedu je aktivacija Akt kinaze koja fosforilira proteine koji reguliraju stanični ciklus i preživljenje stanice.

Fosfolipaza C gama također sadrži SH-2 domenu preko koje ulazi u interakciju s fosfotirozinima aktiviranih receptorskih tirozinskih kinaza. Najvažniji koraci signalnog puta fosfolipaze C su hidroliza PIP2 na diacilglicerol (DAG) koji aktivira protein-kinazu C (PKC) i inozitol-1,4,5-trifosfat (IP3) koji potiče unutarstanično otpuštanje  $Ca^{2+}$ .

U svom nezrelom obliku, pro-BDNF se veže na receptor  $p75^{NTR}$  i aktivira kaskadu koja rezultira aktivacijom jezgrinog faktora  $\kappa B$  (engl. *nuclear factor  $\kappa B$* , NF- $\kappa B$ ), c-Jun N-terminalne kinaze (JNK), te malog G-proteina RhoA. Ovaj put aktivacije rezultira staničnom smrću, negativnom modulacijom morfologije dendrita i gustoće dendritičkih trnova neurona hipokampusa (Zagrebelsky i sur., 2005). Održavanje ravnoteže između nezrelog i zrelog oblika BDNF-a važno je za sinaptičku plastičnost. mBDNF signalizacijom preko TrkB receptora pojačava

proces dugoročnog potenciranja (engl. *long-term potentiation*, LTP), koji je u suštini stanični proces učenja i memorije, a djelovanjem pro-BDNF-a putem receptora p75<sup>NTR</sup> potiče se dugoročna depresija (engl. *long-term depression*, LTD) karakterizirana opadanjem snage sinapse (Minichiello, 2009). Pro-peptid koji nastaje N-terminalnim kidanjem pro-BDNF-a lokaliziran je presinaptički gdje potiče LTD u hipokampusu i regulira morfologiju dendritičkih trnova, tako da sva tri oblika (mBDNF, pro-BDNF i BDNF pro-peptid) moduliraju sinaptičke funkcije u mozgu (Gao i sur., 2022). Upravo navedena svojstva djelovanja BDNF-a otvorila su pitanja o njegovoj potencijalnoj ulozi u AB-u.

### 1.2.2. Moždani neurotrofni čimbenik u kontekstu Alzheimerove bolesti

Razmatrajući lokalizaciju ekspresije BDNF-a, posebno u područjima zahvaćenim neuropatološkim promjenama koje se vežu uz AB, otvorila su se vrata istraživanju njegove uloge u razvoju bolesti i potencijalne kliničke koristi kao terapijske mete ili biljega.

BDNF je nužan za diferencijaciju i preživljenje neurona. Manjak BDNF-a povezan je s fosforilacijom proteina tau, nakupljanjem A $\beta$ , upalom i apoptozom neurona (Wang i sur., 2019). Narušena BDNF/TrkB signalizacija u mozgu odraslih osoba povezana je sa smanjenjem sposobnosti učenja i pamćenja, opadanjem kognitivnih funkcija te poremećajima raspoloženja (Gao i sur., 2022). Rasprostranjen je u cijelom središnjem živčanom sustavu, a najveća koncentracija *BDNF* mRNA izmjerena je u hipokampusu (Hofer i sur., 1990). Ekspresija BDNF-a značajna je i u entorinalnom korteksu koji je ključna regija mozga u procesu učenja i pamćenja, te važna poveznica između korteksa i hipokampusa - BDNF sintetiziran u entorinalnom korteksu aktivno se prenosi do hipokampusa (Nagahara i sur., 2009).

*Post mortem* analizom moždanog tkiva oboljelih od AB-a zabilježena je smanjena ekspresija te snižena koncentracija i pro-BDNF-a i mBDNF-a u regijama mozga zahvaćenim patološkim promjenama (Fahnestock i sur., 2002). Međutim, *post mortem* analize pokazale su i suprotne rezultate – povišenu koncentraciju BDNF-a i receptora TrkB u hipokampusu i parijetalnom korteksu bolesnika oboljelih od AB-a (Durany i sur., 2000; Savaskan i sur., 2000). Zbog navedenog, rezultate takvih studija potrebno je pažljivo interpretirati, pogotovo uzimajući u obzir vrijeme proteklo od smrti do uzorkovanja tkiva i korištenu metodologiju.

Uloga BDNF-a u demenciji posljedica je signalizacije putem receptora TrkB koji su lokalizirani i presinaptički i postsinaptički. BDNF presinaptički potiče otpuštanje neurotransmitera (npr. glutamat, GABA) putem TrkB-MAP kinaza-sinapsin signalne kaskade, a postsinaptički djeluje na razne ionske kanale (npr. receptor NMDA, kalcijevi, natrijevi i kalijevi ionski kanali) (Gao i sur., 2022). Regulirajući otpuštanje neurotransmitera kao odgovor na aktivaciju NF- $\kappa$ B, BDNF djeluje kao poveznica između upale i neuroplastičnosti. Pokazana je razlika u ekspresiji funkcionalnog receptora TrkB normalne duljine (engl. *full-length TrkB receptor*) i skraćenog oblika receptora TrkB (engl. *truncated TrkB receptors*), čije nastajanje potencira A $\beta$  (Wong i sur., 2012; Jerónimo -Santos i sur., 2015). BDNF/TrkB signalizacija može izravno utjecati na metabolizam APP-a pomicanjem puta razgradnje prema  $\alpha$ -sekretazi (neamiloidogeni put) (Nigam i sur., 2017). NGF također utječe na metabolizam APP-a preko receptora TrkA i p75<sup>NTR</sup> te sortilina (Mañucat-Tan i sur., 2019).

Istraživanje na staničnim kulturama neurona P19 dobivenih iz pluripotentnih stanica teratokarcinoma miša pokazalo je da stimulacija BDNF-om djeluje negativno na fosforilaciju tau proteina (Elliott i sur., 2005). S druge strane, inhibicijom signalizacije BDNF-a specifičnim protutijelima dolazi do pojačanog nastanka i akumulacije A $\beta$  u neuronima (Matrone i sur., 2008). Intracerebroventrikularnom primjenom A $\beta$  oligomera smanjuje se ekspresija BDNF-a (Xia i sur., 2017). Nadalje, provedena su istraživanja s APP/PS1 transgeničnim miševima, koji u odrasloj dobi pokazuju narušenu sposobnost pamćenja i hipokampalnu degeneraciju. Pokazano je da poticanje socijalne interakcije s divljim tipom miševa djeluje reverzibilno na navedene promjene, a isti učinak moguće je postići prekomjernom ekspresijom BDNF-a ili ga poništiti prekidom ekspresije BDNF-a (Hsiao i sur., 2014). U APP/PS1 miševa je nakon tretmana BDNF-om također zabilježeno smanjeno nakupljanje A $\beta$  poticanjem neamiloidogenog puta razgradnje APP-a (Nigam i sur., 2017), što upućuje na sposobnost BDNF-a da izravno utječe na metabolizam APP-a. Upala je značajan negativni regulator ekspresije BDNF-a, ali i ostalih neurotrofina. Oštećenje sposobnosti pamćenja uzrokovano lipopolisaharidom i neuroinflamatorni odgovor pripisuju se signalizaciji putem TLR4/NF- $\kappa$ B i inhibiciji ekspresije CREB-a i BDNF-a (Chen i sur., 2019). Međuodnos BDNF-a i NF- $\kappa$ B nužan je za održavanje neurona, ali, u slučaju kronične aktivacije NF- $\kappa$ B, dolazi do upale, neurodegeneracije i opadanja kognitivnih sposobnosti (Gao i sur., 2022).

Zabilježeno je nekoliko polimorfizama u genu *BDNF*, a dva najviše istražena su rs6265 (Val66Met) i rs56164415 (C270T). rs6265 je učestali funkcionalni polimorfizam jednog

nukleotida (engl. *single nucleotide polymorphism*, SNP) koji uzrokuje zamjenu valina (Val) metioninom (Met) u kodonu 66, što utječe na unutarstanični transport i izlučivanje BDNF-a narušavanjem njegovih interakcija s translinom (Chiaruttini i sur., 2009) i sortilinom (Chen i sur., 2005). Rezultati istraživanja povezanosti polimorfizma rs6265 i AB-a su konfliktni. Pokazano je da osobe starije životne dobi koje su nositelji alela A (Met) varijante pokazuju brže propadanje kognitivnih sposobnosti i veći stupanj atrofije hipokampusa, te da bolesnici s MCI koji su nositelji i APOE  $\epsilon$ 4 i alela A imaju ozbiljnije deficite u pamćenju, ali bez značajnih zabilježenih promjena u strukturi mozga (Cechova i sur., 2020). Nadalje, alela A povezan je s višim koncentracijama ukupnog i fosforiliranog tau proteina kod nositelja mutacije (Lim i sur., 2016), a visoka koncentracija A $\beta$  u kombinaciji s prisustvom alela A potencijalno se može koristiti kao prognostički marker prekliničkog AB-a (Lim i sur., 2013). Učinak rs6265 polimorfizma na razvoj AB-a pokazuje različite rezultate ovisno o spolu i stadiju, odnosno uznapređovalosti bolesti. Međutim, dosadašnja ispitivanja nisu povezala mutacije u genu *BDNF* s rizikom od razvoja AB-a, pa tako ni za polimorfizam rs6265. Istraživanje koje su proveli Pivac i sur. pokazalo je značajnu povezanost polimorfizma rs6265 s psihotičnim simptomima u muških ispitanika oboljelih od AB-a (Pivac i sur., 2011). Polimorfizam rs56164415 nalazi se u nekodirajućoj regiji eksona V gena *BDNF* i povezuje se s oblikom bolesti s kasnijim nastupom (Olin i sur., 2005). Istraživanja polimorfizma rs56164415 na njemačkoj i japanskoj populaciji identificirala su alel T kao rizičan, odnosno, kao alel koji je povezan s većim rizikom za razvoj AB-a u usporedbi s alelom C (Riemenschneider i sur., 2002; Kunugi i sur., 2001). S druge strane, ispitivanje na brazilskoj populaciji nije zabilježilo povezanost polimorfizma rs56164415 s razvojem AB-a s kasnijim nastupom (Nishimura i sur., 2004). Osim s AB-om, polimorfizam rs56164415 povezan je i s amiotrofičnom lateralnom sklerozom (ALS) ili Lou Gehrigovom bolesti, koja zahvaća motorne neurone, na način da je zabilježena značajno viša frekvencija nositelja alela T u skupini oboljelih od ALS-a u odnosu na kontrolnu skupinu (Xu i sur., 2017).

### 1.2.3. Klinički potencijal

Klinički potencija BDNF-a može se razmatrati iz perspektive biljega i iz perspektive terapijske mete. Kombiniranje perifernog BDNF-a s drugim biljezima potencijalno bi iznjedrilo dijagnostički panel za rano i neinvazivno otkrivanje i praćenje bolesti, a ciljanim djelovanjem na povećanje razine BDNF-a u zahvaćenim moždanim područjima potencijalno bi se mogli poboljšati ishodi bolesnika oboljelih od AB-a.

Suplementacija egzogenim BDNF-om ograničena je njegovom nestabilnošću i raspoloživošću (Poduslo i Curran, 1996), tako da se većina istraživačkih strategija fokusira na izravno poticanje stvaranja endogenog BDNF-a (npr. genska terapija) ili indirektno pojačavanje signalizacije i izlučivanja BDNF-a (npr. tjelovježba). Predložene precizne lokalne metode primjene egzogenog BDNF-a poput intrahipokampalnih, intrakortikalnih i intrakohlearnih infuzija su iznimno invazivne s nejasno definiranim doziranjem i trajanjem primjene, ali intranazalna primjena BDNF-a se izdvojila kao opcija sa značajnim kliničim potencijalom zbog velike dostupne površine za apsorpciju lijeka u nazalnoj mukozii, zaobilaska krvno-moždane barijere i metabolizma prvog prolaska kroz jetru, jednostavne primjene bez igli i bolje adherencije bolesnika, te manje potrebne doze i minimalnog sistemskog izlaganja (Gao i sur., 2022). Kako bi se izbjegla aktivacija imunskog odgovora i razgradnja BDNF-a nazalnim citokromom P450 ili proteazama, razmatra se primjena raznih nosača (npr. polimerne nanočestice) kako bi se poboljšao profil otpuštanja BDNF-a (Gao i sur., 2022). Endogene strategije za povećanje razine BDNF-a uključuju oralnu primjenu lijekova za koje je pokazano da posredno utječu na sintezu i izlučivanje BDNF-a (inhibitori kolinesteraze, estrogeni, antidepresivi, kanabinoidi, biljni ekstrakti, suplementi sa zinkom i litijem), gensku terapiju, fizikalne intervencije (tjelovježba, laserska terapija, repetitivna transkranijalna magnetska stimulacija), pa čak i regulaciju oralnog i intestinalnog mikrobioma (Gao i sur., 2022). Što se tiče genske terapije, u veljači 2021. godine lansirano je kliničko ispitivanje faze I za procjenu sigurnosti i učinkovitosti modificiranog adeno-asociranog virusnog vektora (serotip 2) AAV2-BDNF u liječenju bolesnika s AB-om ili MCI-jem (UC San Diego Health, 2021). Prethodno primjena AAV2-NGF u randomiziranom kliničkom ispitivanju pokazala se sigurnom i dobro podnošljivom, ali bez utjecaja na kliničke ishode ili odabrane biljega za AB (Rafii i sur., 2018).

Radna skupina za molekularne i biokemijske biljege Alzheimerove bolesti (The Ronald and Nancy Reagan Research Institute of the Alzheimer's Association and the National Institute on Aging Working Group) već je 1998. okarakterizirala idealan biljeg kao onaj koji uspješno detektira temeljne karakteristike neuropatologije AB-a, validiran je u neuropatološki potvrđenim slučajevima AB-a, precizan je u smislu rane dijagnostike i razlikovanja od drugih demencija, pouzdan, neinvazivan, jednostavne izvedbe i jeftin. Razmatrajući navedene karakteristike, optimalan uzorak za takvu analizu bila bi periferna krv. Razine BDNF-a u perifernoj krvi u snažnoj su korelaciji s razinama u likvoru (Pan i sur., 1998; Fernandes i sur., 2014). Snižena koncentracija BDNF-a zabilježena je već u stadiju MCI-ja i pokazuje korelaciju



s kognitivnom funkcijom (Peng i sur., 2005). Velika meta-analiza Qin i sur. pokazala je značajno snižene vrijednosti BDNF-a u perifernoj krvi u oboljelih od AB-a u odnosu na zdrave ispitanike, uz trend snižene koncentracije BDNF-a kod oboljelih u MCI stadiju u odnosu na zdrave ispitanike, ali razlika između skupina oboljelih s MCI-jem i s AB-om nije detektirana (Qin i sur., 2017). Meta-analiza Kim i sur. nije pokazala statistički značajnu razliku u koncentraciji BDNF-a između oboljelih od AB-a i MCI-ja u odnosu na zdrave ispitanike, ali je pokazala da je razina perifernog BDNF-a povišena u ranom stadiju AB-a, a snižena u kasnijim stadijima u bolesnika s lošijim rezultatima MMSE testa (Kim i sur., 2017), što bi upućivalo na prisutnost kompenzacijskih mehanizama u ranijim stadijima neurodegeneracije. Važan izvor BDNF-a u tijelu su trombociti, gdje se BDNF pohranjuje, a sintetiziraju ga vaskularne stanice, epitelne stanice, mišićne stanice, leukociti i makrofagi (Gao i sur., 2022). Vodeći računa o tome, bitno je koja se vrsta uzorka koristi za analizu. Koncentracija BDNF-a u plazmi objektivniji je prikaz stanja u organizmu u odnosu na koncentraciju u serumu koja je pod utjecajem sadržaja BDNF-a u trombocitima i stanicama imunskog sustava (Fujimura i sur., 2002). Konfliktni rezultati dosadašnjih meta-analiza mogu biti posljedica heterogenosti dostupnih istraživanja te manjka standardizacije u korištenoj metodologiji i pohrani uzoraka.

Odgovor na problematiku precizne i rane dijagnostike AB-a vjerojatno će biti u kombinaciji različitih biljega, a perspektivnom se pokaza proteomika. Ray i sur. su, koristeći panel od 18 plazmatskih proteina, uspješno identificirani oboljele od AB-a u odnosu na zdrave ispitanike s 90 %-tnom točnošću, te predvidjeli konverziju iz MCI-ja u AB unutar 2 - 6 godina (Ray i sur., 2007). Prema tome, snaga perifernog BDNF-a kao neinvazivnog biljega leži u kombinaciji s drugim klinički korisnim pokazateljima neuropatoloških promjena povezanih s AB-om. Na primjer, osjetljivost i specifičnost testa drastično se povećava kada se serumski BDNF kombinira zajedno s proteinom neuralnih niti povezanim s AB-om (engl. *AD-associated neuronal thread protein*, AD7c-NTP) u urinu, kao biljeg za MCI s APOE ε4 genotipom (Wang i sur., 2015).

## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

AB je progresivni neurodegenerativni poremećaj koji stihijski utječe na bolesnika i njegove bližnje, a u uznapređovalim stadijima zahtijeva multidisciplinarnu skrb i cjelodnevnu njegu. Ranije postavljanje dijagnoze, prije nastanka značajnih kognitivnih deficita, te pravovremena terapijska intervencija, uvelike bi promijenili kvalitetu života i ishode oboljelih. U tu se svrhu intenzivno istražuju novi biljezi i terapijske mete, poput BDNF-a.

BDNF je protein iz skupine neurotrofina, čimbenika rasta koji reguliraju razvoj, preživljenje i funkciju neurona. Nadalje, BDNF djeluje na sinaptičku plastičnost, prometovanje neurotransmitera, učenje i pamćenje. Smanjena ekspresija BDNF-a povezana je s neuropatologijom karakterističnom za AB. Cilj ovog istraživanja je ispitati povezanost genske ekspresije BDNF-a i koncentracije proteina BDNF u plazmi kod oboljelih od AB-a i MCI-ja, te na taj način ispitati može li se razina ekspresije BDNF-a povezati sa stupnjem kognitivnog deficita. Istraživanje također cilja ispitati povezanost dva najčešće istraživana polimorfizma gena *BDNF* s dijagnozom AB-a, s razinom kognitivnog oštećenja te utvrditi postoji li ikakav utjecaj navedenih polimorfizama na ekspresiju gena BDNF te koncentraciju ovog neurotrofina na periferiji (u uzorcima plazme).

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Ispitanici

U istraživanje je uključeno ukupno 153 ispitanika oba spola (41,8 % muškaraca) koji su liječeni u Klinici za psihijatriju „Vrapče“ u Zagrebu. Prema dijagnozi, ispitanici su podijeljeni na one s dijagnozom AB-a (N=69) te na ispitanike s dijagnozom MCI-ja (N=84). Dijagnoza je postavljena na temelju kliničke procjene psihijatra u skladu s važećim dijagnostičkim kriterijima i smjericama. Za procjenu kognitivnih deficita korišteni su psihometrijski testovi - MMSE i CDT.

Svi ispitanici kojima je dijagnosticirana vaskularna ili miješana demencija, tumori ili upalne bolesti SŽS-a, traume mozga, sistemske metaboličke bolesti te druga neurološka oboljenja (npr. Huntingtonova bolest, Pickova demencija) isključeni su iz ispitivanja.

Istraživanje je provedeno uz dozvolu Etičkog povjerenstva za istraživanje Klinike za psihijatriju Vrapče i u potpunosti je usklađeno s etičkim standardima definiranim Helsinškom deklaracijom. Svim ispitanicima ili njihovim skrbnicima u detalje je objašnjena svrha i postupak istraživanja te su svi ispitanici ili njihovi skrbnici dobrovoljno potpisali informirani pristanak.

#### 3.2. Obrada uzoraka krvi

Uzorci krvi ispitanika prikupljeni su natašte tijekom rutinske obrade u prijepodnevnim satima, u skladu s Nacionalnim preporukama za uzorkovanje venske krvi Hrvatskog društva za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu (Nikolac i sur., 2014). Za prikupljanje uzorka od 8 mL korištene su standardizirane epruvete s podtlakom (BD Vacutainer®, Becton Dickson, SAD) uz 2 mL antikoagulansa ACD (engl. *acid citrat dextrose*) koji sadrži limunsku kiselinu, natrijev citrat i dekstrozu. Dostava i obrada uzoraka u Laboratoriju za molekularnu neuropsihijatriju Instituta „Ruđer Bošković“ učinjene su unutar 24 sata od uzorkovanja. Prvo je iz pune krvi izdvojena plazma centrifugiranjem 3 min pri 1100 g, zatim iz plazme trombociti centrifugiranjem 15 min pri 5087 g, a preostala frakcija s leukocitima korištena je za izolaciju ukupne ribonukleinske kiseline (engl. *ribonucleic acid*, RNA) i genomske deoksiribonukleinske kiseline (engl. *deoxyribonucleic acid*, DNA). Uzorci plazme pohranjeni su na -80 °C do daljnje analize. Preostala frakcija krvi koja sadrži leukocite i eritrocite pohranjena je na -20 °C.

### 3.3. Izolacija ukupne RNA iz periferne krvi

Za izolaciju RNA iz uzoraka krvi korišten je komercijalni komplet Invitrogen® PureLink® RNA Mini Kit (Thermo Fisher Scientific, SAD), prema uputama izvođača.

Sadržaj kompleta:

- Pufer za lizu
- Pufer za ispiranje I
- Pufer za ispiranje II

Korištene kemikalije:

- $\beta$ -merkaptetanol (Sigma-Aldrich, SAD)
- 100 % etanol (Gram-Mol, RH)

Prije samog početka izolacije, potrebno je pohranjene uzorke odmrznuti na sobnoj temperaturi i promiješati ih na valjkastoj miješalici. Slijedi priprema konačnog pufera za lizu stanica dodatkom 2  $\mu$ L  $\beta$ -merkaptetanola na svakih 0,2 mL pufera za lizu, te priprema pufera za ispiranje II u koji je potrebno dodati 60 mL 96 – 100 %-tnog etanola.

Prvi dio postupka uključuje lizu stanica i homogenizaciju uzorka. Nakon odmrzavanja i miješanja uzoraka, u sterilnu mikroeprijetu volumena 1,5 mL dodaje se 0,2 mL uzorka i 0,2 mL prethodno pripremljenog pufera za lizu stanica. Ona se stavlja u tresilicu i temeljito protrese kako bi se stanice lizirale. Sljedeći je korak centrifugiranje nastalog lizata 2 min pri 12 000 g na sobnoj temperaturi. Nakon centrifugiranja supernatant se premješta u novu sterilnu mikroeprijetu istog volumena i dodaje se 200  $\mu$ L 100 %-tnog etanola. Uz pomoć pipete potrebno je raspršiti talog ispuštanjem i uvlačenjem uzorka nekoliko puta, a takav promiješani uzorak premjesti se u kolonu za centrifugiranje (engl. *spin cartridge*) s mikroeprijetom za sakupljanje (engl. *recovery tube*). Slijedi korak centrifugiranja 15 sekundi pri 12 000 g na sobnoj temperaturi, nakon kojeg se za daljnji postupak čuva kolona, a sadržaj mikroepriete za sakupljanje se odbacuje.

Sljedeći dio postupka su tri ciklusa ispiranja. Za prvo ispiranje dodaje se 700  $\mu$ L pufera za ispiranje I na kolonu za centrifugiranje i centrifugira 15 sekundi pri 12 000 g na sobnoj temperaturi. Sadržaj iz mikroepriete se odbacuje, a kolona za centrifugiranje premješta se u novu sterilnu mikroeprijetu za centrifugiranje. Slijedi drugi ciklus ispiranja s 500  $\mu$ L prethodno pripremljenog pufera za ispiranje II s etanolom i centrifugiranje 15 sekundi pri 12

000 g na sobnoj temperaturi. Navedeni korak ponavlja se još jednom, bez promjene mikropruvete za sakupljanje.

Zadnji dio postupka je elucija RNA s kolone. Kolona za centrifugiranje se osuši centrifugiranjem 1 min pri 12 000 g na sobnoj temperaturi. Mikropruveta za sakupljanje se odbacuje, a kolona za centrifugiranje premješta se u novu mikropruvetu za eluciju RNA. U sredinu kolone dodaje se 60  $\mu$ L vode bez ribonukleaza (RNaza) i inkubira 1 min na sobnoj temperaturi. Slijedi centrifugiranje 1 min pri 12 000 g na sobnoj temperaturi pri čemu se pročišćena RNA eluira u mikropruvetu. Tako dobiven uzorak pročišćene RNA pohranjuje se na temperaturi -80 °C do daljnje obrade.

### 3.4. Određivanje koncentracije izolirane RNA

Koncentracija pročišćene RNA određena je pomoću uređaja NanoPhotometer® C40 (Implen, Njemačka) mjerenjem apsorbancije na valnoj duljini 260 nm u uzorku ukupnog volumena 1 - 2  $\mu$ L. Koncentracija izolirane RNA računa se prema sljedećoj formuli:

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

Omjer apsorbancije pri 260 nm i 280 nm ( $A_{260}/A_{280}$ ) koristi se za određivanje čistoće izolirane RNA, odnosno stupnja zagađenja preostalim proteinima iz uzorka. Uzorak je zadovoljavajuće čistoće kada je vrijednost  $A_{260}/A_{280}$  veća od 1,8, a odlične čistoće ~2,0. Za procjenu onečišćenja solima, ugljikohidratima, peptidima i fenolom koristi se omjer  $A_{260}/A_{230}$  sa zadovoljavajućim vrijednostima u rasponu 2,0 – 2,2.

### 3.5. Reverzna transkripcija izolirane RNA u komplementarnu DNA

Pripremni korak za određivanje ekspresije gena lančanom reakcijom polimeraze (engl. *polymerase chain reaction*, PCR) jest pretvorba RNA u komplementarnu DNA (engl. *complementary DNA*, cDNA) koja će biti kalup u PCR reakciji. Za izvođenje reverzne transkripcije korišten je komercijalno dostupan komplet RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific, SAD) koji je do trenutka upotrebe bio pohranjen u zamrzivaču.

Sadržaj kompleta RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit:

- Reverzna transkriptaza RevertAid M-MuLV RT (200 U/ $\mu$ L)

- Inhibitor RNaza RiboLock (20 U/ $\mu$ L)
- Reakcijski pufer - 5x koncentriran
- Mješavina deoksiribonukleotida (dNTP) - 10x koncentrirana
- Početnice (nasumični heksameri) (100  $\mu$ M)
- Voda bez nukleaza

Nakon odmrzavanja kompleta, sve kemikalije se kratko centrifugiraju, a kroz daljni postupak drže na ledu. Za 0,1 ng – 5,0  $\mu$ g početnog RNA kalupa, u uzorak se dodaje 1  $\mu$ L početnica (nasumičnih heksamera) i vode bez RNaza do ukupnog volumena 12  $\mu$ L. U ovom slučaju, u svaku reakciju dodano je 30 ng ukupne RNA. Reakcijska smjesa se potom inkubira 5 minuta na temperaturi 65 °C u uređaju 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems®, Thermo Fisher Scientific, SAD), zbog mogućnosti da je RNA kalup bogat CG nukleotidima ili sadrži sekundarne strukture. Nakon inkubacije, uzorci se ohlade na ledu, kratko centrifugiraju te opet vrata na led. Slijedi dodatak 4  $\mu$ L reakcijskog pufera (5x koncentriran), 1  $\mu$ L RiboLock inhibitora RNaza (20 U/  $\mu$ L), 2  $\mu$ L mješavine dNTP-a (10mM) i 1  $\mu$ L reverzne transkriptaze RevertAid M-MuLV RT (200 U/ $\mu$ L) tako da ukupni volumen reakcijske smjese za svaki uzorak bude 20  $\mu$ L. Uzorci se potom kratko centrifugiraju, zatim inkubiraju prvo 5 min na temperaturi 25 °C, a onda 60 min na 42 °C. Reakcija se zaustavlja inkubacijom u trajanju 5 min na temperaturi 70 °C.

Reakcijom je dobivena jednolančana cDNA koja će biti kalup za umnažanje u reakciji PCR-a pri određivanju ekspresije gena. Ukoliko se uzorci neće odmah koristiti za daljnu analizu, porhanjuju se na temperaturi -20 °C do tjedan dana, odnosno -70 °C za dulje razdoblje čuvanja.

### 3.6. Određivanje ekspresije gena za protein BDNF

Za određivanje ekspresije *BDNF* gena korištena je metoda PCR u stvarnom vremenu (engl. *real-time* PCR), odnosno kvantitativni PCR (engl. *quantitative PCR*, qPCR), na uređaju ABI Prism 7300 Sequence Detection System (Applied Biosystems®, Thermo Fisher Scientific, SAD). Korišten je komercijalno dostupan komplet TaqMan™ Gene Expression Assay (Applied Biosystems®, Thermo Fisher Scientific, SAD). Kao kontrolni (engl. *housekeeping*) gen korišten je gen za gliceraldehid-3-fosfat-dehidrogenazu (engl. *glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*, GAPDH).

Metodologija se temelji na specifičnoj hibridizaciji ciljne cDNA i sonde obilježene fluorescentnom bojom čiji signal se može zabilježiti. Svaka sonda u reakcijskoj smjesi obilježena je na 5' kraju fluorescentnom bojom 6-FAM (fluorescein), a na 3' kraju se nalazi nefluorescentni prigušivač (engl. *nonfluorescent quencher*, NFQ) koji rezonantnim prijenosom energije blokira emisiju fluorescencije kada su obje molekule vezane na oligonukleotid. Tijekom same reakcije, zahvaljujući egzonukleaznoj aktivnosti Taq polimeraze, oligonukleotidna sonda se razgrađuje i nukleotidi se otpuštaju u otopinu, a fluorofor i prigušivač više se ne nalaze u blizini jedan drugoga, te uređaj bilježi fluorescencijski signal fluorofora. Fluorescencija pojedinog uzorka prati se pomoću računalnog programa SDS v1.4.1. (Applied Biosystems®, Thermo Fisher Scientific, SAD).

Korištene kemikalije: TaqMan™ Gene Expression Assay:

- Voda bez RNaza
- Taqman Gene Expression MasterMix – 2x koncentriran
- TaqMan™ Gene Expression Assay (početnica i sonda obilježena fluorescentnom bojom 6-FAM) za gen *GADPH*, Hs00266705\_g1 - 20x koncentrirana
- TaqMan™ Gene Expression Assay (početnica i sonda obilježena fluorescentnom bojom 6-FAM) za gen *BDNF*, Hs02718934\_s1 - 20x koncentrirana

Prije pristupanja izvodenju metode, uzroke cDNA i TaqMan™ Gene Expression Assay komplete potrebno je odmrznuti, promiješati na vrtložnoj mješalici i centrifugirati te promiješati matičnu otopinu za određivanje ekspresije gena Taqman Gene Expression MasterMix. Reakcija se izvodi na MicroAmp® (Applied Biosystems®, Thermo Fisher Scientific, SAD) reakcijskoj pločici za optički čitač s 96 jažica. Na jednoj pločici izmjerena je ekspresija gena za BDNF i za GAPDH iz 8 uzoraka u kvadruplikatu na način da je konačni volumen reakcijske smjese u jažici bio 20 µL, a ukupna količina cDNA u rasponu od 1 do 100 ng. Nakon unosa reakcijske smjese u jažice, na pločicu se pažljivo nanosi MicroAmp® optički adhezivni film (Applied Biosystems®, Thermo Fisher Scientific, SAD). Sastav reakcijske smjese za qPCR prikazan je u [Tablici 1](#), a uvjeti reakcije prikazani su u [Tablici 2](#).

**Tablica 1.** Reakcijska smjesa za qPCR

Sastojci PCR smjese	Početna koncentracija	Konačna koncentracija	Volumen / $\mu\text{L}$
Uzorak cDNA	1,50 ng/ $\mu\text{l}$	0,25 ng/ $\mu\text{l}$ (oko 5 ng po reakciji)	3,3
TaqMan Gene Expression Master Mix	2 $\times$	1 $\times$	10
TaqMan <sup>TM</sup> Gene Expression Assay - početnice i sonda istraživanog gena (BDNF/COMT/GAPDH)	20 $\times$	1 $\times$	1
Voda bez RNAza			do 20 $\mu\text{L}$
Ukupan reakcijski volumen			20

**Tablica 2.** Uvjeti qPCR reakcije

Faza reakcije		Temperatura	Vrijeme
Održavanje (1 ciklus)		50 °C	2 min
Aktivacija polimeraze i početna denaturacija (1 ciklus)		95 °C	10 min
Umnažanje (50 ciklusa)	Denaturacija	95 °C	15 s
	Prijanjanje i elongacija	60 °C	1 min

### 3.6.1. Kvantifikacija genske ekspresije $\Delta\Delta\text{Ct}$ metodom

Porast fluorescencije, koji detektira uređaj tijekom qPCR-a, proporcionalan je početnoj količini cDNA u uzorku, a broj ciklusa u kojem fluorescentni signal prijeđe prag detekcije fluorescencije naziva se Ct vrijednost (engl. *threshold cycle*). Ukoliko cDNA u uzorku ima više, prije će postići prag detekcije i time će Ct vrijednost biti niža, a ukoliko cDNA u uzorku ima manje, Ct vrijednost biti će viša. Pri određivanju relativne ekspresije ispitivanog gena koristi se komparativna Ct metoda,  $\Delta\Delta\text{Ct}$  (Livak i Schmittgen, 2001) koristeći sljedeće formule:

$$\Delta\text{Ct}_{\text{AB}} = \text{Ct}_{\text{ciljni gen, AB}} - \text{Ct}_{\text{GAPDH, AB}}$$

$$\Delta\text{Ct}_{\text{MCI}} = \text{Ct}_{\text{ciljni gen, MCI}} - \text{Ct}_{\text{GAPDH, MCI}}$$

$$\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct}_{\text{AB/MCI}} - \Delta\text{Ct}_{\text{kalibrator}}$$

$$\text{Normalizirana ekspresija ciljnog gena} = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$$



Razlika u Ct vrijednosti za gen *BDNF* normalizira se za ekspresiju gena *GAPDH* i izražava kao  $\Delta$ Ct. Nadalje, razlika u ekspresiji ciljnog gena u ispitanika oboljelih od AB-a izražava se kao relativna ekspresija u odnosu na ekspresiju u ispitanika s MCI-jem (kontrolni uzorak). Na taj način dobivene  $\Delta$ Ct vrijednosti za uzorke ispitanika s AB-om i ispitanike s MCI-jem uspoređene su s  $\Delta$ Ct vrijednosti kalibratora (s prosječnom  $\Delta$ Ct vrijednošću MCI uzoraka koji su uzeti kao kalibrator).

### 3.7. Izolacija genomske DNA iz krvi

Za izdvajanje genomske DNA iz krvi korištena je metoda isoljavanja (engl. *salting-out*) osmišljena od strane Miller i sur. 1988. godine kao alternativa metodama koje su koristile otrovna organska otapala (Miller i sur., 1988). Temelji se na principu povećanja ionske jakosti otopine dodatkom soli čime se narušavaju interakcije hidrofилnih aminokiselinskih ostataka proteina i molekula vode zbog kompeticije s ionima iz soli. Proteini se prvo razgrađuju dodatkom enzima proteinaze K u stanični lizat, a zatim isoljavanjem agregiraju i talože, te ih je na taj način moguće ukloniti. Nakon centrifugiranja oni zaostaju na dnu epruvete, a iz supernatanta se precipitira DNA dodatkom izopropanola.

Korištene kemikalije:

- Pufer za liziranje eritrocita (engl. *red cell lysis buffer*, RCLB): 10 mM Tris (Trizma® base, Sigma Aldrich, SAD), 5 mM MgCl<sub>2</sub> (Kemika, Hrvatska), 10 mM NaCl (Kemika, Hrvatska); pH 7,6
- Pufer SE: 75mM NaCl, 25mM EDTA (Sigma Aldrich, SAD); pH 8
- NaCl (Kemika, Hrvatska): 5 M otopina
- Proteinaza K (TaKaRa Bio, Japan): 20 mg/ml
- Natrijev dodecil sulfat (engl. *sodium dodecyl sulfate*, SDS) (Sigma Aldrich, SAD): 10 %-tna otopina
- Etanol (Kemika, Hrvatska): 96 %-tna i 70 %-tna otopina
- Izopropanol (Kemika, Hrvatska)
- Pufer TE (Sigma Aldrich, SAD): 10 mM Tris (Trizma® base, Sigma Aldrich, SAD), 1 mM EDTA (Sigma Aldrich, SAD); pH 7,6

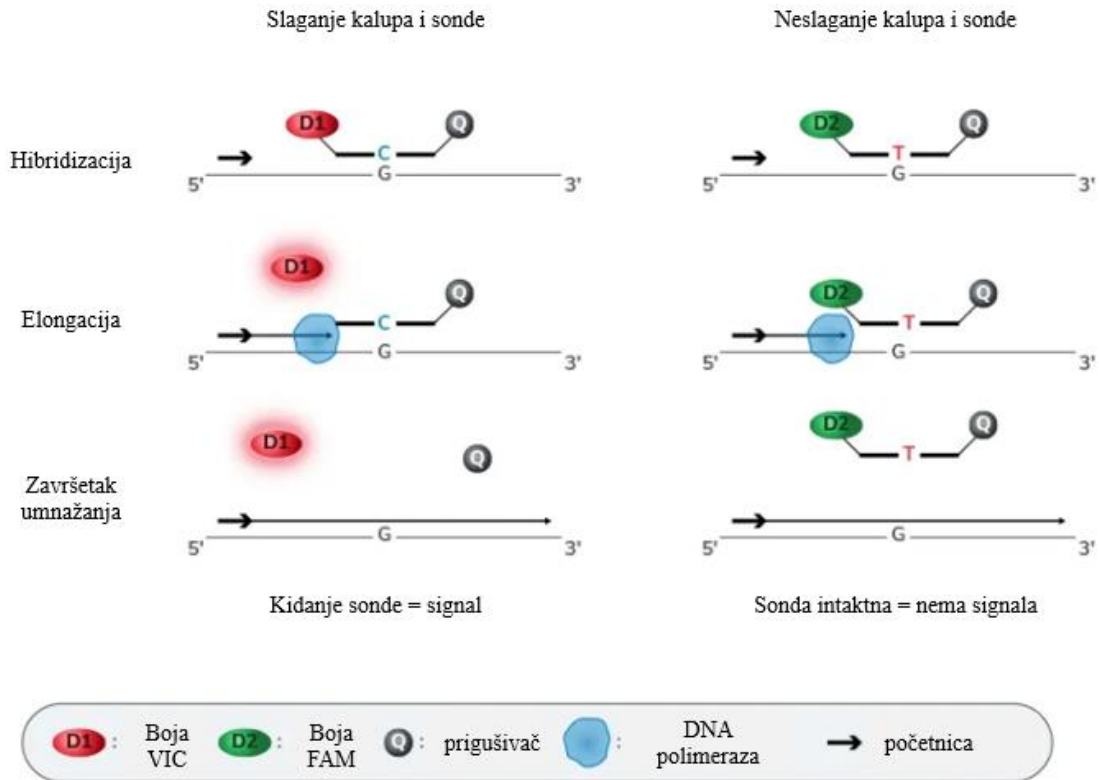
### Postupak:

Nakon odmrzavanja uzoraka slijedi miješanje na valjkastoj miješalici u trajanju 20 min. Potom se iz svakog uzorka izdvoji 300 µl krvi i premjesti u novu mikroepriuvetu volumena 1,5 ml (Eppendorf, Ujedinjeno Kraljevstvo) i slijedi liziranje eritrocita. Uzrocima se dodaje 900 µl RCLB-a, dobro se promiješaju vrtložnom miješalicom i drže na ledu u trajanju od 10 min. Nakon centrifugiranja 2 min pri 13 000 g na 4 °C, lizirani eritrociti ostaju u supernatantu koji se odbacuje, a istalože se intaktni leukociti. Talog se dodatno pročisti resuspendiranjem u 900 µl RCLB-a i ponovnim centrifugiranjem 2 min pri 13 000 g na 4 °C, a nakon 3-4 ispiranja RCLB-om, kada je talog dovoljno čist, dodaje se 300 µl SE pufera i 30 µl 10 %-tnog SDS-a. Uzorci se tada promiješaju laganim okretanjem mikroepriuvete. Slijedi dodatak 1,5 µl proteinaze K te inkubacija uzoraka u termobloku na 56 °C u trajanju 2 sata pri čemu dolazi do lize leukocita. Nakon toga se u uzorak dodaje trećina volumena 5 mM NaCl, otprilike 200 µl, kratko miješa vorteks miješalicom (10 s) i centrifugira 5 min pri 13 000 g na sobnoj temperaturi. Genomska je DNA tada otopljena u supernatantu koji se premješta u novu sterilnu mikroepriuvetu, a ostali stanični dijelovi su istaloženi. Slijedi dodatak 2 volumna udjela hladnog izopropanola, otprilike 800 µl, i lagano miješanje uzorka. U ovom koraku istaložena DNA je vidljiva golim oko kao paučasto bijelo klupko. Centrifugiranjem 2 min pri 13 000 g se istaložena DNA se spušta na dno mikroepriuvete, a supernatant odbacuje. Talog se dodatno ispire s 400 µl 75 %-tnog etanola i još jednom centrifugira 2 min pri 13 000 g na sobnoj temperaturi. Supernatant se odbacuje, a mikroepriuvete dodatno posuše, prvo prislanjanjem na papir, a zatim u digestoru s otvorenim poklopcem 20 min. Nakon sušenja, talogu se dodaje 100 µl TE pufera i uzorci se ostavljaju preko noći na sobnu temperaturu kako bi se otopila DNA, te se pohranjuju na -20 °C.

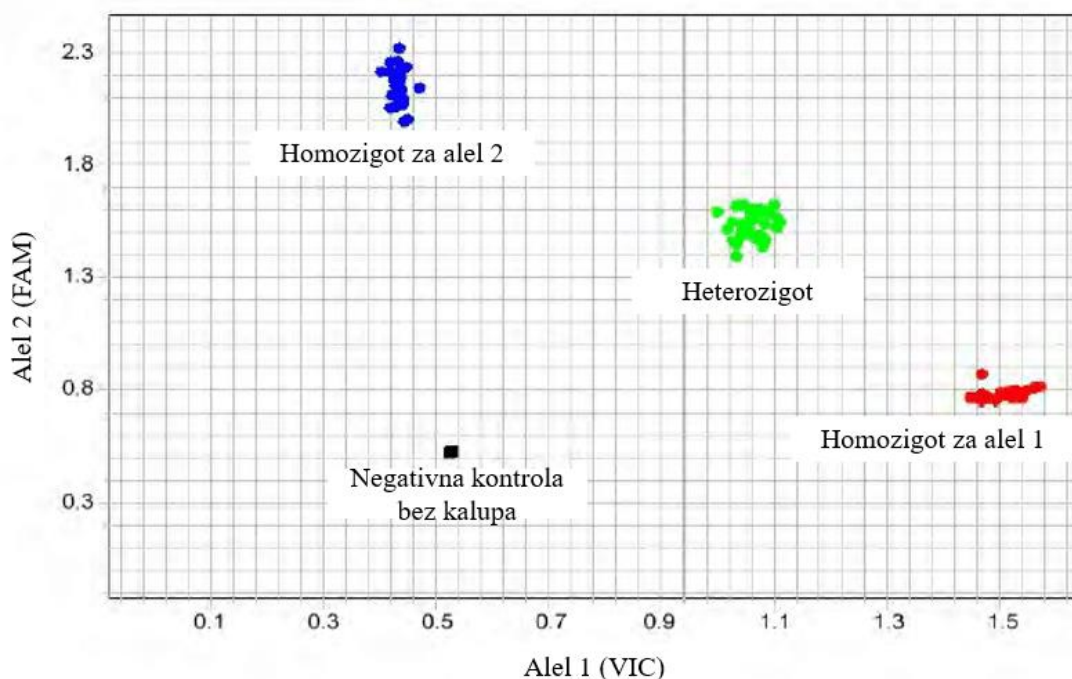
### 3.8. Genotipizacija polimorfizama gena za moždani neurotrofni čimbenik

Za genotipizaciju su odabrana dva polimorfizma gena *BDNF*, Val66Met (rs6265) koji se nalazi u kodonu 66 i C270T (rs56164415) smješten u 5' nekodirajućoj regiji gena. Metoda izbora za genotipizaciju je PCR u stvarnom vremenu, odnosno kvantitativni PCR, prethodno objašnjen kod određivanja ekspresije gena *BDNF* (vidi Određivanje ekspresije gena za protein BDNF). Fluorescentno obilježene sonde su u ovom slučaju specifične za slijed koji sadrži jednu promijenjenu bazu (Slika 3). Jačina i vrsta zabilježenog signala omogućuju određivanje genotipa na način da fluorescencija jedne boje upućuje na prisustvo jednog alela (homozigotnost), a fluorescencija obje boje upućuje na prisutnost oba alela (heterozigotnost).

Računalni program kao rezultat prikazuje razinu fluorescencije za pojedinu fluorescentnu boju u svakom uzorku, razinu fluorescencije za svaki fluorofor, te grafički prikaz navedenih podataka (Slika 4).



**Slika 3.** Prikaz principa genotipizacije metodom qPCR. Preuzeto i prilagođeno od: <https://azurebiosystems.com/qpcr-applications/genotyping/>, zadnji pristup kolovoz 2023.



**Slika 4.** Primjer grafičkog prikaza rezultata raspodjele genotipova (engl. *allelic discrimination plot*). Preuzeto i prilagođeno od TaqMan® SNP Genotyping Assays User Guide, revision A.0, 2014, Applied Biosystems®, Thermo Fisher Scientific, SAD.

Korištena je komercijalno dostupna TaqMan® mješavina početnica i sonde (Applied Biosystems®, Thermo Fisher Scientific, SAD) koja se sastoji od specifičnih početnica, TaqMan® sonde obilježene fluorescentnom bojom VIC ili FAM i reakcijskog pufera, te TaqMan® otopina za genotipizaciju (Applied Biosystems®, Thermo Fisher Scientific, SAD) u kojoj se nalazi termostabilna DNA-polimeraza, deoksiribonukleotidi i pufer. Genotipizacija je napravljena na uređaju ABI Prism7300 Real time PCR System apparatus (Applied Biosystems®, Thermo Fisher Scientific, SAD).

Korištene kemikalije:

- Komercijalno dostupni kompleti (Applied Biosystems®, Thermo Fisher Scientific, SAD) - TaqMan® mješavina početnica i sonde (engl. *TaqMan® Pre-designed SNP Genotyping Assay*):
  - Pristupni broj za Applied Biosystems®: C\_11592758\_10 (rs6265), C\_\_89097201\_10 (rs56164415)

- Otopina za genotipizaciju (Applied Biosystems®, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, SAD): TaqMan® matična mješavina za genotipizaciju (engl. *TaqMan® Genotyping Master Mix*)

Sastav reakcijske smjese i uvjeti reakcije prikazani su u [Tablici 3](#), odnosno [Tablici 4](#). Ukupan volumen reakcijske smjese je 25  $\mu\text{L}$ .

**Tablica 3.** Sastav reakcijske smjese za genotipizaciju qPCR-om.

\* Volumen se prilagođava razmjerno ukupnom volumenu reakcijske smjese; # 1-20 ng genomske DNA po reakcijskoj smjesi

Sastojci reakcijske smjese	Početna koncentracija	Konačna koncentracija	Volumen po reakciji / $\mu\text{L}^*$
TaqMan® matična mješavina za genotipizaciju	2x	1x	12,5
TaqMan® mješavina početnica i sonde	4x	1x	0,625
Genomska DNA razrijeđena u deH <sub>2</sub> O	oko 1,8 ng/ $\mu\text{L}$	oko 0,8 ng/ $\mu\text{L}^{\#}$	11,25

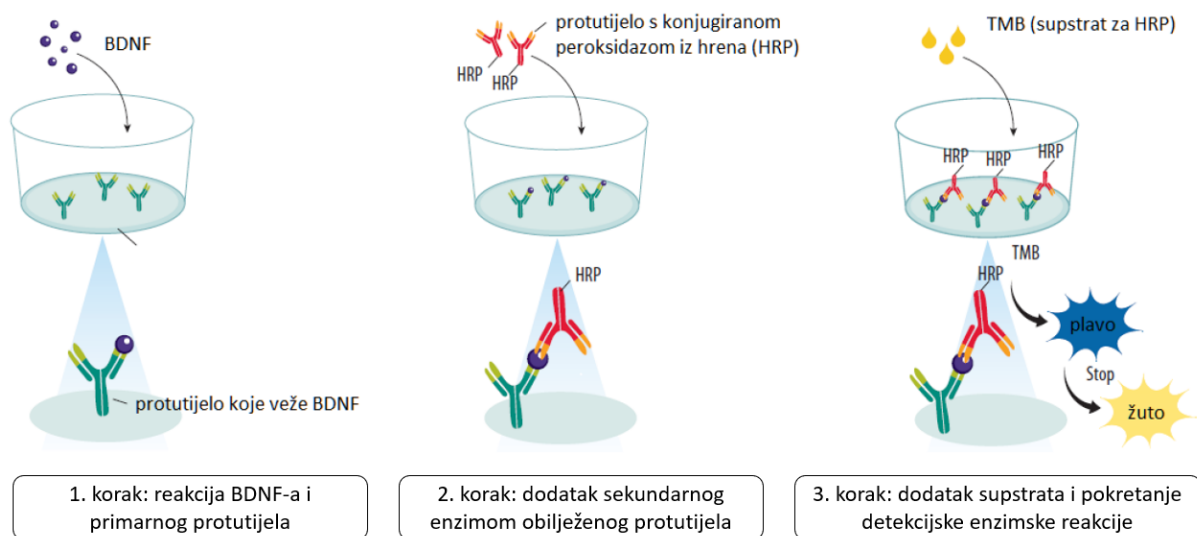
**Tablica 4.** Uvjeti reakcije za genotipizacijom qPCR-om.

Faza reakcije		Temperatura	Vrijeme
Početna denaturacija (1 ciklus)		95 °C	10 min
Umnažanje (55 ciklusa)	Denaturacija	92 °C	15 s
	Prijanjanje i elongacija	60 °C	1 min

### 3.9. Određivanje koncentracije moždanog neurotrofnog čimbenika u plazmi

Koncentracija BDNF-a u plazmi određena je korištenjem komercijalno dostupnog ELISA kompleta Total BDNF Quantikine® ELISA Kit tvrtke R&D Systems, Inc. (SAD) koji sadrži rekombinantni BDNF ekspimiran u Sf21 ovarijskim stanicama jesenske sovice i protutijela koja ga prepoznaju. Odabran je jer se prema literaturnim podacima uspješno koristi za detekciju mBDNF-a u plazmi, ali ne i proBDNF-a (Yoshida i sur., 2012). Metoda se temelji se na sendvič

principu: na mikropločicu je imobilizirano primarno monoklonsko protutijelo na koje se veže željeni protein, a na nastali kompleks se veže sekundarno obilježeno protutijelo, u ovom slučaju konjugirano s enzimom peroksidazom iz hrena (engl. *horseradish peroxidase*, HRP). Potom slijedi serija ispiranja kojima se uklanja višak nevezanog protutijela. Zadnji korak je dodatak otopine supstrata enzima čime se pokreće enzimska reakcija i dolazi do razvoja boje intenziteta proporcionalnog količini ispitivanog proteina. Korištenjem navedenog kompleta moguća je detekcija BDNF-a u uzorku koncentracije ispod 20 pg/ml.



**Slika 5.** Princip metode određivanja koncentracije moždanog neurotrofnog čimbenika (BDNF) u plazmi pomoću Total BDNF Quantikine® ELISA kompleta tvrtke R&D Systems, Inc. (SAD). Preuzeto i prilagođeno od <https://www.rndsystems.com/products/quantikine-colorimetric-sandwich-elisa-assay-principle>, zadnji pristup: kolovoz, 2023.

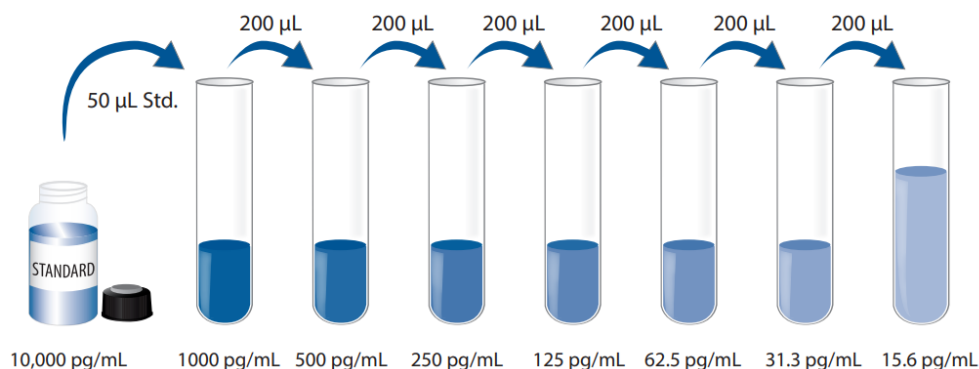
Sadržaj Total BDNF Quantikine® ELISA kompleta:

- Mikropločica: polistirenska mikropločica s 96 jažica presvučenim mišjim monoklonskim protutijelom koje veže BDNF
- BDNF standard: liofilizirani rekombinantni humani protein BDNF
- BDNF konjugat (engl. *BDNF Conjugate*): mišje monoklonsko protutijelo koje veže BDNF konjugirano s peroksidazom iz hrena
- Razrjeđivač kompleta RD1S (engl. *Assay Diluent RD1S*): puferirana proteinska baza
- Kalibrirajuća otopina za razrjeđivanje RD6P (engl. *Calibrator Diluent RD6P*): životinjski serum

- Pufer za ispiranje: 25x koncentriran
- Reagens za obojenje A (engl. *Color Reagent A*): stabilizirani vodikov peroksid
- Reagens za obojenje B (engl. *Color Reagent B*): stabilizirani kromogen tetrametilbenzidin
- Otopina za zaustavljanje reakcije (engl. *Stop Solution*): 2N sumporna kiselina

#### Postupak:

Prije mjerenja koncentracije BDNF-a u uzorcima plazme, napravljen je dodatni korak centrifugiranja 10 min na 10 000 g pri temperaturi 4 °C s ciljem uklanjanja mogućih ostataka trombocita. Zatim slijedi razrjeđivanje uzoraka 4 puta kalibrirajućom otopinom RD6P koja je dio korištenog kompleta. U svaku od 96 jažica mikrotitarske pločice prvo se dodaje 100 µl razrjeđivača RD1S koji je dio kompleta, a zatim 50 µl uzoraka plazme ili 50 µl prethodno pripremljenih razrjeđenja BDNF standarda. I standardi i svi uzorci plazme dodani su u jažice u duplikatima, a u dvije jažice dodana je i negativna kontrola (50 µl kalibrirajuće otopine za razrjeđivanje RD6P). Zatim slijedi inkubacija - mikropločica je prekrivena adhezivnom folijom i ostavljena 2 sata na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije, u svaku je jažicu dodano 100 µl BDNF konjugata, odnosno sekundarno protutijelo na koje je vezana peroksidaza iz hrena. Slijedi još jedna inkubacija u trajanju 1 sata na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije, serijom od ukupno 3 ispiranja s po 400 µl razrijeđenog pufera za ispiranje po jažici, ispire se višak monoklonskog protutijela koje se veže na BDNF iz plazme. Nakon ispiranja jažice se dobro posuše dekantiranjem. U svaku jažicu zatim se dodaje 200 µl tzv. supstratne otopine koja je dobivena miješanjem reagensa za obojenje A i B u jednakom omjeru i koja sadržava vodikov peroksid. Mikropločica je inkubirana 30 min na sobnoj temperaturi u mraku. Nakon 30 min u jažice je dodana otopina za zaustavljanje reakcije i unutar 30 min je na ELISA čitaču (Thermo Labsystems Multiskan EX Microplate Reader, SAD) izmjerena apsorbancija uzoraka pri 450 nm, uz korekciju pri 570 nm. Koristeći poznate koncentracije BDNF-a u standardnim otopinama, naknadno je određena koncentracija BDNF-a pojedinih uzoraka prema uputama izvođača.



**Slika 6.** Priprema standardnih otopina BDNF-a. Preuzeto iz Uputa o proizvodu, Total BDNF Quantikine® ELISA Kit, dostupno na: [https://www.rndsystems.com/products/total-bdnf-quantikine-elisa-kit\\_dbnt00](https://www.rndsystems.com/products/total-bdnf-quantikine-elisa-kit_dbnt00), zadnji pristup: kolovoz 2023.

### 3.10. Statistička obrada podataka

Za statističku obradu podataka korišten je program GraphPad Prism verzija 4.00 (GraphPad Software, San Diego, California, SAD), a za grafički prikaz rezultata program Microsoft Excel 2019. Razina značajnosti  $\alpha$  postavljena je na 0,05, a svi korišteni testovi bili su dvosmjerni. Kolmogorov-Smirnov test korišten je za utvrđivanje normalnosti razdiobe pojedinih parametara. Podaci koji su odstupali od normalne razdiobe, kao što su klinički i demografski parametri, te relativna razina ekspresije gena BDNF i koncentracija proteina BDNF u plazmi, prikazani su kao medijan i raspon (minimum i maksimum).

Za usporedbu vrijednosti različitih istraživanih parametara korišten je Mann-Whitney U test, jer podaci nisu imali normalnu razdiobu. Povezanost pojedinih demografskih i kliničkih parametara s relativnom ekspresijom gena BDNF te koncentracijom proteina BDNF u plazmi određena je izračunavanjem Spearmanovog koeficijenta korelacije ( $r_s$ ) zbog odstupanja od normalne razdiobe podataka. Za analize u kojima je bilo potrebno provjeriti utjecaj većeg broja nezavisnih varijabli na jednu zavisnu varijablu korištena je dvosmjerna ANOVA.

U slučaju kategoričkih podataka, kao što su frekvencije genotipova i alela, distribucija između pojedinih skupina uspoređena je  $\chi^2$ -testom koji se također koristio za provjeru odstupanja distribucije genotipova od Hardy-Weinbergove ravnoteže.



S obzirom na to da se oba istraživana polimorfizma nalaze unutar istog gena i s obzirom da u literaturi postoje naznake da navedeni SNP u genomu nisu potpuno nezavisni, već između njih postoji neravnoteža udruživanja (LD), korišten je program Haploview, verzija 4.2 (Broad Institute of Harvard and MIT, SAD) (Barrett i sur., 2005). Za određivanje LD-a koristi se standardizirani koeficijent  $D'$ . Vrijednosti  $D'$  iznad 0,80 označavaju da su dva istraživana polimorfizma u LD-u.

## 4. REZULTATI

### 4.1. Demografski podaci

U istraživanje je uključeno ukupno 153 ispitanika oba spola (41,8 % muškaraca), koji su prema dijagnozi podijeljeni na ispitanike oboljele od AB-a (N=69) i one s dijagnozom MCI-ja (N=84). Nije bilo značajne razlike u raspodjeli spolova među istraživanim skupinama ( $\chi^2=0,89$ ;  $df=1$ ;  $p=0,346$ ).

Demografski i klinički podaci ispitanika prikazani su u [Tablici 5](#). Normalnost distribucije navedenih varijabli ispitana je Kolmogorov-Smirnovim testom, koji je za sve varijable pokazao odstupanje od normalne distribucije, te je za usporedbu vrijednosti između skupina ispitanika korišten neparametrijski Mann-Whitney U test. Među skupinama nije zabilježena razlika u ITM-u ( $p=0,497$ ), obujmu struka ( $p=0,966$ ), ukupnom kolesterolu ( $p=0,707$ ) te HDL-kolesterolu ( $p=0,981$ ), LDL-kolesterolu ( $p=0,877$ ), trigliceridima ( $p=0,997$ ) niti u koncentraciji glukoze ( $p=0,308$ ). Međutim, ispitanici oboljeli od AB-a statistički su značajno stariji od ispitanika s MCI-jem ( $p\leq 0,001$ ). Nadalje, ispitanici oboljeli od AB-a su u odnosu na ispitanike s MCI-jem postigli lošije rezultate MMSE testa ( $p\leq 0,001$ ) i CDT ( $p\leq 0,001$ ), odnosno, pokazali su značajniju narušenost kognitivnih funkcija.

**Tablica 5.** Demografski i klinički podaci ispitanika s blagim kognitivnim poremećajem (MCI) i ispitanika s Alzheimerovom bolesti (AB). Svi podaci su prikazani kao medijan (raspon).

Demografske i kliničke karakteristike ispitanika	Ispitanici N (% muškaraca)		Mann-Whitney U test	
	Blagi kognitivni poremećaj 84 (43,0)	Alzheimerova bolest 69 (37,7)	U	p
<b>Dob (godine)</b>	71,0 (57,0-87,0)	79,0 (63,0-88,0)	4535,5	<b>&lt;0,001</b>
<b>ITM (kg/m<sup>2</sup>)</b>	22,0 (18,4-32,4)	23,4 (18,5-31,9)	3082,0	0,497

<b>Obujam struka (cm)</b>	86,0 (71,0-101,0)	86,0 (72,0-99,0)	2886,5	0,966
<b>Ukupni kolesterol (mmol/l)</b>	5,7 (3,2-8,8)	5,7 (3,2-8,8)	2795,5	0,707
<b>HDL-kolesterol (mmol/l)</b>	1,3 (0,7-3,0)	1,3 (0,7-3,0)	2891,5	0,981
<b>LDL-kolesterol (mmol/l)</b>	3,5 (0,8-5,6)	3,3 (0,8-5,8)	2856,0	0,877
<b>Trigliceridi</b>	1,8 (0,7-6,7)	1,8 (0,7-6,7)	2897,0	0,997
<b>Glukoza natašte (mmol/l)</b>	5,5 (4,5-11,8)	5,6 (4,7-11,8)	3175,0	0,308
<b>MMSE</b>	27,0 (21,0-28,0)	13,0 (10,0-24,0)	27,5	<b>&lt;0,001</b>
<b>CDT</b>	5,0 (1,0-5,0)	2,0 (1,0-5,0)	243,0	<b>&lt;0,001</b>

CDT, test crtanja sata; HDL, lipoproteini velike gustoće (engl. *high-density lipoproteins*); ITM, indeks tjelesne mase; LDL, lipoproteini male gustoće (engl. *low-density lipoproteins*); MMSE, Mini-mental test; N, broj ispitanika.

#### 4.2. Koncentracija moždanog neurotrofnog čimbenika u plazmi

Koncentracija BDNF-a u plazmi (izražena u ng/ml) određena je pomoću komercijalno dostupnog ELISA kompleta (Total BDNF Quantikine® ELISA Kit tvrtke R&D Systems, Inc. (SAD)). Korištenjem Kolmogorov-Smirnovog testa utvrđeno je odstupanje vrijednosti koncentracija BDNF-a od normalne razdiobe, te su sukladno tome za statističku obradu podataka korišteni neparametrijski testovi.

Uzimajući u obzir potencijalni utjecaj prethodno navedenih demografski i kliničkih parametara na koncentraciju BDNF-a u plazmi, analiziran je Spearmanov koeficijent korelacije ( $r_s$ ) svih demografskih i kliničkih parametara s koncentracijom BDNF-a kod svih ispitanika zajedno ([Tablica 6](#)). Nije zabilježena značajna povezanost pojedinih demografskih i kliničkih parametara s koncentracijom BDNF-a u plazmi. Korištenjem Mann-Whitney U testa ispitan je

moćući utjecaj spola na koncentraciju BDNF-a u obje skupine ispitanika. Niti u skupini ispitanika oboljelih od AB-a ( $U=462,5$ ;  $p=0,232$ ) niti u skupini ispitanika s MCI-jem ( $U=877,5$ ;  $p=0,975$ ) nije bilo značajne razlike u koncentraciji BDNF-a između muškaraca i žena. Isti trend zabilježen je i kada su svi ispitanici promatrani zajedno ( $U=2653,5$ ;  $p=0,472$ ). Obzirom na navedene rezultate, nije bilo potrebno uvoditi korekciju koncentracije BDNF-a u plazmi za utjecaj dobi, spola, ITM-a, obujma struka, ukupnog kolesterola, HDL-a, LDL-a, triglicerida i glukoze.

**Tablica 6.** Korelacija koncentracije BDNF-a u plazmi s demografskim i kliničkim parametrima kod ispitanika s blagim kognitivnim poremećajem (MCI) i ispitanika s Alzheimerovom bolesti (AB) (N=153).

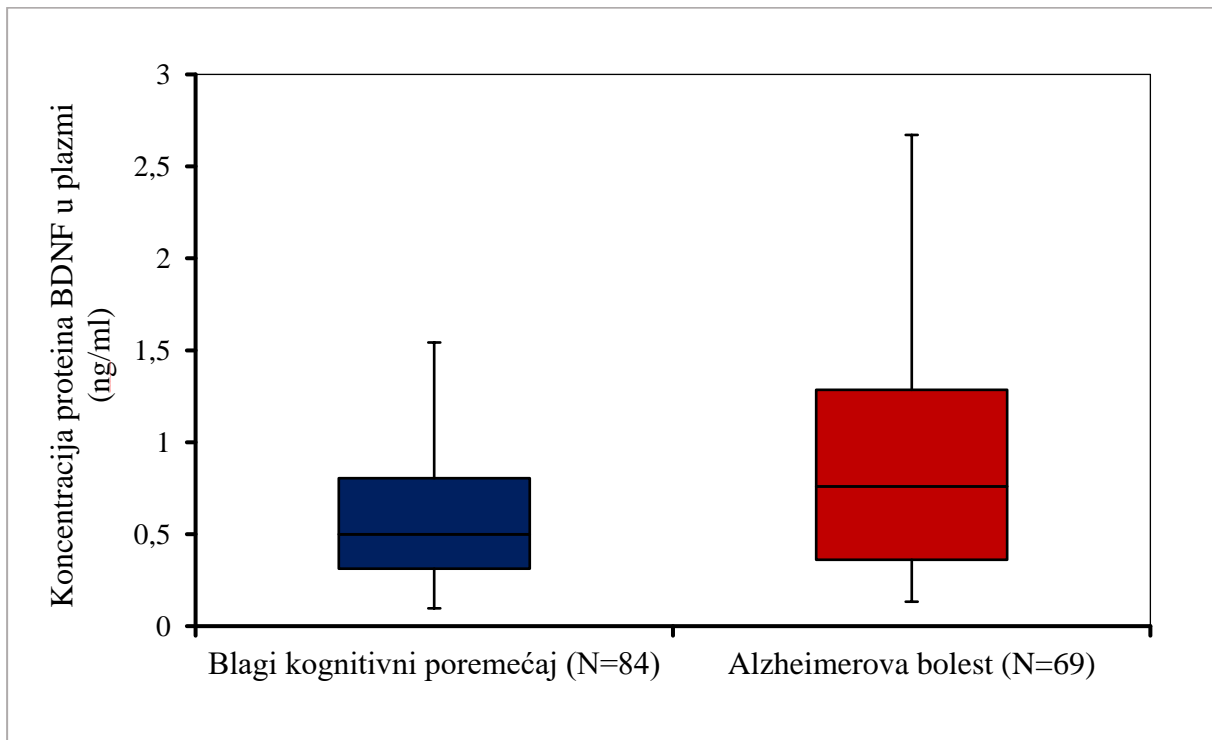
Demografske i kliničke karakteristike ispitanika	Koncentracija proteina BDNF	
	$r_s$	p
Dob (godine)	0,144	0,076
ITM ( $\text{kg}/\text{m}^2$ )	0,094	0,248
Obujam struka (cm)	0,104	0,200
Ukupni kolesterol (mmol/l)	-0,038	0,640
HDL-kolesterol (mmol/l)	-0,119	0,143
LDL-kolesterol (mmol/l)	0,026	0,747
Trigliceridi	0,041	0,614
Glukoza natašte (mmol/l)	0,027	0,736

HDL, lipoproteini velike gustoće; ITM, indeks tjelesne mase; LDL, lipoproteini male gustoće;

$r_s$ , Spearmanov koeficijent korelacije.

#### 4.2.1. Usporedba koncentracije moždanog neurotrofnog čimbenika u plazmi između ispitanika oboljelih od Alzheimerove bolesti ili blagog kognitivnog (spoznajnog) poremećaja

Pomoću Mann-Whitney U testa utvrđena je statistički značajna razlika između koncentracije BDNF-a u plazmi ispitanika s MCI-jem i ispitanika oboljelih od AB-a ( $U=3456,0$   $p=0,041$ ). Navedena razlika posljedica je više koncentracije BDNF-a u ispitanika oboljelih od AB-a u odnosu na ispitanike s MCI-jem ([Slika 7](#)).



**Slika 7.** Koncentracija proteina BDNF u plazmi ispitanika s blagim kognitivnim poremećajem (MCI) i ispitanika s dijagnozom Alzheimerove bolesti (AB).

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

#### 4.2.2. Povezanost koncentracije moždanog neurotrofnog čimbenika u plazmi s kognitivnim simptomima demencije

Za procjenu razine narušenosti kognitivnih funkcija ispitanika korišteni su psihometrijski testovi MMSE i CDT. Normalnost razdiobe broja bodova postignutih na psihometrijskim testovima za sve skupine bolesnika, te normalnost razdiobe vrijednosti koncentracije BDNF-a u uzorcima plazme, ispitane su pomoću Kolmogorov-Smirnovog test. Uzimajući u obzir

odstupanja od normalne razdiobe, u daljnjoj analizi korišteni su neparametrijski testovi za obradu podataka.

Povezanost rezultata ostvarenih na MMSE testu i koncentracije BDNF-a u plazmi ispitana je određivanjem Spearmanovog koeficijenta korelacije ( $r_s$ ) bez obzira na dijagnozu, te zasebno kod ispitanika oboljelih od AB-a i kod ispitanika s MCI-jem (Tablica 7). Zabilježena je značajna negativna korelacija između broja bodova ostvarenih na MMSE testu i koncentracije BDNF-a u plazmi kada se svi ispitanici promatraju zajedno ( $p=0,016$ ), ali taj trend se gubi razdvajanjem ispitanika u skupine prema dijagnozi (Tablica 7).

**Tablica 7.** Korelacija koncentracije proteina BDNF u plazmi ispitanika oboljelih od Alzheimerove bolesti (AB) ili blagog kognitivnog (spoznajnog) poremećaja (MCI) s brojem bodova na testu MMSE.

Dijagnoza	$r_s$	<b>p</b>
<b>Svi ispitanici</b> (N=153)	-0,195	<b>0,016</b>
<b>Blagi kognitivni poremećaj</b> (N=84)	-0,102	0,355
<b>Alzheimerova bolest</b> (N=69)	-0,074	0,544

Na isti način ispitana je povezanost broja bodova ostvarenih na testu CDT i koncentracije BDNF-a u plazmi kod svih uključeni ispitanika, te kod ispitanika oboljelih od AB-a i ispitanika s MCI-jem zasebno. Zabilježena je značajna negativna korelacija između broja bodova ostvarenih na testu CDT i koncentracije BDNF-a u plazmi kada se svi ispitanici promatraju zajedno ( $p=0,014$ ), međutim, taj trend se gubi promatranjem ispitanika podijeljenih u skupine prema dijagnozi (Tablica 8).

**Tablica 8.** Korelacija koncentracije protein BDNF u plazmi ispitanika oboljelih od Alzheimerove bolesti (AB) ili blagog kognitivnog (spoznajnog) poremećaja (MCI) s brojem bodova na testu CDT.

Dijagnoza	$r_s$	<b>p</b>
<b>Svi ispitanici</b>	-0,198	<b>0,014</b>

(N=153)		
<b>Blagi kognitivni poremećaj</b>	-0,176	0,110
(N=84)		
<b>Alzheimerova bolest</b>	-0,040	0,742
(N=69)		

Navedeni rezultati upućuju na postojanje korelacije između koncentracije BDNF-a u perifernoj krvi i stupnja kognitivnog oštećenja među ispitanicima, odnosno, da se niža koncentracija BDNF-a u plazmi može povezati s boljim kognitivnim funkcioniranjem.

#### 4.3. Ekspresija gena za moždani neurotrofni čimbenik

Razlika u ekspresiji gena *BDNF* između ispitanika oboljelih od AB-a i ispitanika s MCI-jem određena je metodom kvantitativnog PCR-a, odnosno PCR-a u stvarnom vremenu. Za određivanje relativne kvantifikacije ekspresije gena *BDNF* korištena je komparativna Ct ( $\Delta\Delta C_t$ ) metoda, a relativna ekspresija prikazana je kao  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  vrijednost.

Normalnost razdiobe vrijednosti relativne ekspresije gena *BDNF* ispitana je korištenjem Kolmogorov-Smirnov testa. Uzimajući u obzir odstupanje od normalne razdiobe, u daljnjoj analizi korišteni su neparametrijski testovi. Nadalje, zbog mogućeg utjecaja pojedinih demografskih i kliničkih parametara na ekspresiju gena *BDNF*, analizirana je korelacija (Spearmanov koeficijent korelacije,  $r_s$ ) svih navedenih parametara s relativnom ekspresijom gena *BDNF* kod svih ispitanika zajedno ([Tablica 9](#)). Nije zabilježena značajna povezanost pojedinih kliničkih i demografskih parametara s razinom relativne ekspresije gena *BDNF* kod ispitanika oboljelih od AB-a i ispitanika s dijagnozom MCI-ja.

Pomoću Mann-Whitney U testa ispitan je mogući utjecaj spola na relativnu ekspresiju gena *BDNF*. Ni u skupini ispitanika oboljelih od AB-a niti u skupini ispitanika s dijagnozom MCI-ja nije zabilježena značajna razlika u relativnog ekspresiji gena *BDNF* između žena i muškaraca ( $U=515,5$ ;  $p=0,590$ ;  $U=894,0$ ;  $p=0,857$ ). Isti trend je uočen i kada su svi ispitanici promatrani zajedno ( $U=2670,5$ ;  $p=0,511$ ). Navedeni rezultati nisu upućivali na potrebu za daljnjom korekcijom vrijednosti relativne ekspresije gena *BDNF* za utjecaj dobi, spola, ITM-a, obujma struka, vrijednosti ukupnog kolesterola, HDL-a, LDL-a, triglicerida i glukoze.

**Tablica 9.** Korelacija relativne ekspresije gena *BDNF* s demografskim i kliničkim parametrima kod ispitanika s blagim kognitivnim (spoznajnim) poremećajem (MCI) i ispitanika s Alzheimerovom bolesti (AB) (N=153).

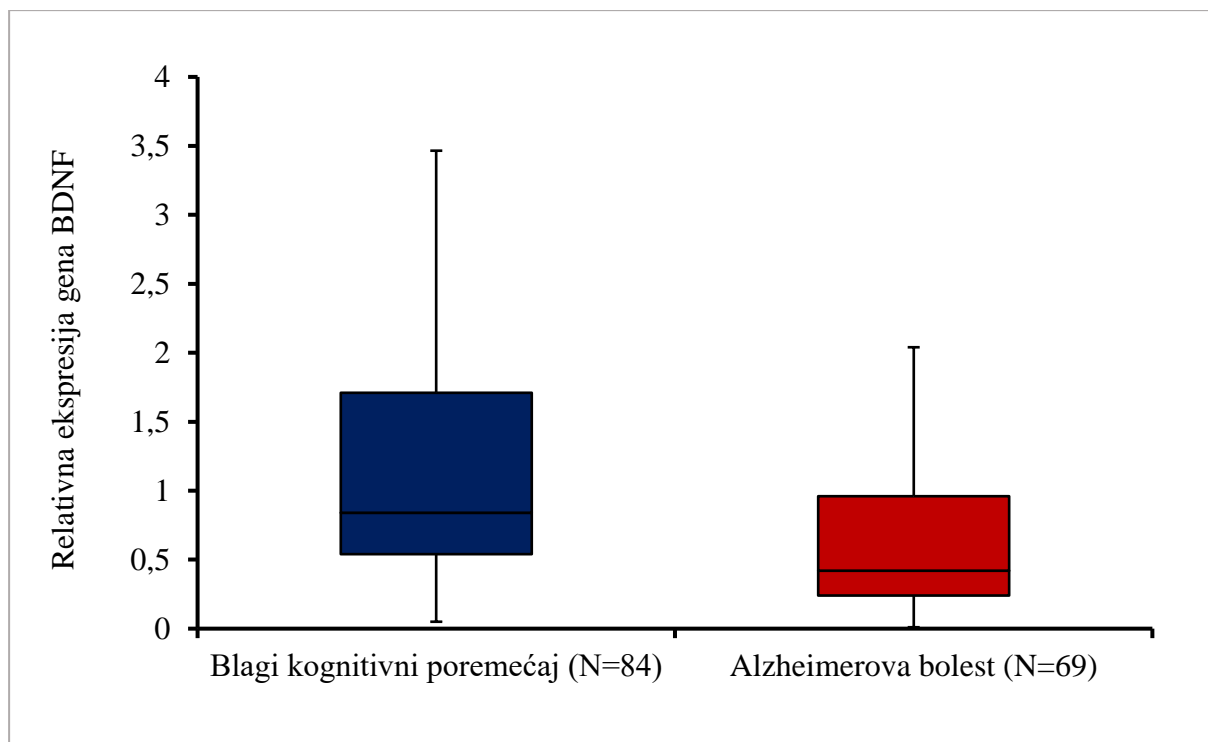
Demografske i kliničke karakteristike ispitanika	Ekspresija gena <i>BDNF</i>	
	$r_s$	<b>p</b>
Dob (godine)	-0,122	0,132
ITM (kg/m <sup>2</sup> )	-0,019	0,812
Obujam struka (cm)	-0,022	0,791
Ukupni kolesterol (mmol/l)	0,008	0,926
HDL-kolesterol (mmol/l)	0,026	0,752
LDL-kolesterol (mmol/l)	-0,052	0,524
Trigliceridi	0,030	0,716
Glukoza natašte (mmol/l)	0,045	0,580

HDL, lipoproteini velike gustoće; ITM, indeks tjelesne mase; LDL, lipoproteini male gustoće;  $r_s$ , Spearmanov koeficijent korelacije.

#### 4.3.1. Usporedba relativne ekspresija gena za moždani neurotrofni čimbenik između ispitanika oboljelih od Alzheimerove bolesti (AB) ili blagog kognitivnog (spoznajnog) poremećaja (MCI)

Za usporedbu relativne ekspresije gena *BDNF* između ispitanika oboljelih od AB-a i ispitanika s MCI-jem korišten je Mann-Whitney U test. Zabilježena je statistički značajna razlika ( $U=1826,5$ ;  $p<0,001$ ) u relativnoj ekspresiji gena *BDNF* između navedenih skupina ispitanika ([Slika 8](#)), koja proizlazi iz smanjene ekspresije gena *BDNF* u skupini ispitanika oboljelih od AB-a u odnosu na ispitanike s MCI-jem.





**Slika 8.** Relativna ekspresija gena *BDNF* kod ispitanika s blagim kognitivnim poremećajem (MCI) i ispitanika s dijagnozom Alzheimerove bolesti (AB).

Središnji pravokutnik predstavlja vrijednosti od donjeg do gornjeg kvartila (od 25. do 75. percentila), a središnja linija predstavlja medijan. Horizontalne linije se pružaju od minimalne do maksimalne vrijednosti. Za relativnu kvantifikaciju ekspresije gena *BDNF* korištena je komparativna Ct ( $\Delta\Delta C_t$ ) metoda, odnosno relativna ekspresija gena *BDNF* prikazana je kao  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  vrijednost.

#### 4.3.2. Povezanost relativne ekspresija gena za moždani neurotrofni čimbenik s kognitivnim simptomima demencije

Razina oštećenja kognitivnih funkcija ispitanika procijenjena je pomoću MMSE i CDT psihometrijskih testova. Normalnost razdiobe broja ostvarenih bodova na pojedinom testu ispitana je Kolmogorov-Smirnovim testom. Uzimajući u obzir odstupanja od normalne razdiobe, za daljnju analizu korišteni su neparametrijski testovi.

Povezanost između ostvarenog broja bodova na MMSE testu i relativne ekspresije gena *BDNF* u svim uzorcima zajedno, te u podskupinama bolesnika prema dijagnozi, ispitana je računanjem Spearmanovog koeficijenta korelacije ( $r_s$ ) ([Tablica 10](#)). Zabilježena je značajna pozitivna korelacija između ostvarenog broja bodova na MMSE testu i relativne ekspresije gena *BDNF* kada se svi ispitanici promatraju zajedno ( $p < 0,001$ ), međutim, taj trend se gubi kada se promatraju podskupine ispitanika podijeljenih prema dijagnozi.

**Tablica 10.** Korelacija relativne ekspresije gena *BDNF* u ispitanika oboljelih od Alzheimerove bolesti (AB) ili blagog kognitivnog (spoznajnog) poremećaja (MCI) s brojem bodova na testu MMSE.

Dijagnoza	$r_s$	$p$
<b>Svi ispitanici</b> (N=153)	0,325	<b>&lt;0,001</b>
<b>Blagi kognitivni poremećaj</b> (N=84)	0,066	0,552
<b>Alzheimerova bolest</b> (N=69)	0,133	0,275

Povezanost ostvarenog broj bodova na CDT testu i relativne ekspresije gena *BDNF* u svim uzorcima zajedno, te u podskupinama bolesnika prema dijagnozi, ispitana je računanjem Spearmanovog koeficijenta korelacije ( $r_s$ ) (Tablica 11). Zabilježena je značajna pozitivna korelacija između ostvarenog broja bodova na CDT testu i relativne ekspresije gena *BDNF* kada se svi ispitanici promatraju zajedno ( $p < 0,001$ ). Nadalje, zabilježena je značajna pozitivna korelacija između ostvarenog broja bodova na CDT testu i relativne ekspresije gena *BDNF* u ispitanika s MCI-jem ( $p = 0,048$ ). U skupini ispitanika oboljelih od AB-a navedena korelacija nije statistički značajna ( $p = 0,070$ ), ali primjećuje se sličan trend.

**Tablica 11.** Korelacija relativne ekspresije gena *BDNF* u ispitanika oboljelih od Alzheimerove bolesti (AB) ili blagog kognitivnog (spoznajnog) poremećaja (MCI) s brojem bodova na testu CDT.

Dijagnoza	$r_s$	$p$
<b>Svi ispitanici</b> (N=153)	0,365	<b>&lt;0,001</b>
<b>Blagi kognitivni poremećaj</b> (N=84)	0,216	<b>0,048</b>
<b>Alzheimerova bolest</b> (N=69)	0,220	0,070

Navedeni rezultati upućuju na postojanje korelacije između relativne ekspresije gena *BDNF* i razine kognitivnog oštećenja u konkretnom uzorku ispitanika, na način da je viša razina ekspresije gena *BDNF* povezana s boljim kognitivnim funkcioniranjem.

#### 4.4. Povezanost koncentracije moždanog neurotrofnog čimbenika u plazmi s relativnom ekspresijom gena za moždani neurotrofni čimbenik

Povezanost koncentracije BDNF-a u plazmi i relativne ekspresije gena *BDNF* ispitana je računanjem Spearmanovog koeficijenta ( $r_s$ ) za sve ispitanike zajedno, te u podskupinama na temelju dijagnoze ([Tablica 12](#)). Zabilježena je značajna negativna korelacija između koncentracije BDNF-a u plazmi i relativne ekspresije gena *BDNF* kad se promatraju svi ispitanici zajedno ( $p=0,048$ ). Isti trend zabilježen je u podskupini bolesnika s dijagnozom MCI-ja ( $p=0,014$ ), međutim, značajnost se gubi u podskupini bolesnika oboljelih od AB-a ([Tablica 12](#)).

**Tablica 12.** Korelacija koncentracije proteina BDNF s relativnom ekspresijom gena *BDNF* u ispitanika oboljelih od Alzheimerove bolesti (AB) ili blagog kognitivnog (spoznajnog) poremećaja (MCI).

Dijagnoza	$r_s$	$p$
Svi ispitanici (N=153)	-0,160	<b>0,048</b>
Blagi kognitivni poremećaj (N=84)	-0,268	<b>0,014</b>
Alzheimerova bolest (N=69)	0,003	0,982

#### 4.5. Polimorfizmi gena za moždani neurotrofni čimbenik

Metodom PCR-a u stvarnom vremenu ili kvantitativnog PCR-a određeni su genotipovi svih ispitanika za dva polimorfizma gena *BDNF* - rs6265 ili Val66Met i rs56164415 ili C270T – čije su karakteristike (pozicija na kromosomu, aleli, udio rjeđeg alela u populaciji ispitanika uključenih u ispitivanje, te  $p$  vrijednost koja se odnosi na provjeru odstupanja raspodjele genotipova od Hardy-Weinbergove ravnoteže (HWE)) navedene u [Tablici 13](#).

Raspodjela genotipova za polimorfizam rs6265 gena *BDNF* bila je unutar HWE kod ispitanika oboljelih od AB-a ( $\chi^2=3,80$ ;  $df=1$ ;  $p=0,051$ ), međutim, uočeno je odstupanje kod ispitanika s dijagnozom MCI-ja ( $\chi^2=0,50$ ;  $df=1$ ;  $p=0,480$ ).

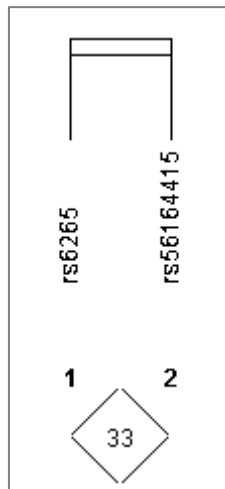
U cijelom uzorku ispitanika (N=153), za polimorfizam rs56164415 zabilježen je samo jedan homozigot TT, te su ispitanici u svim daljnjim izračunima podijeljeni na homozigote CC i nositelje alela T (homozigot TT i heterozigoti CT).

**Tablica 13.** Istraživani polimorfizmi gena *BDNF*.

Oznaka SNP-a	Stara oznaka	Pozicija na kromosomu 11	Lokacija	Aleli		Udio rjeđeg alela	HWE p vrijednost
				G	A		
rs6265	Val66Met	27679916	ekson	G	A	0,222	0,835
rs56164415	C270T	27721735	intron	C	T	0,065	0,647

HWE, Hardy-Weinbergova ravnoteža; Met, metionin; Val, valin; SNP, polimorfizam jedne baze

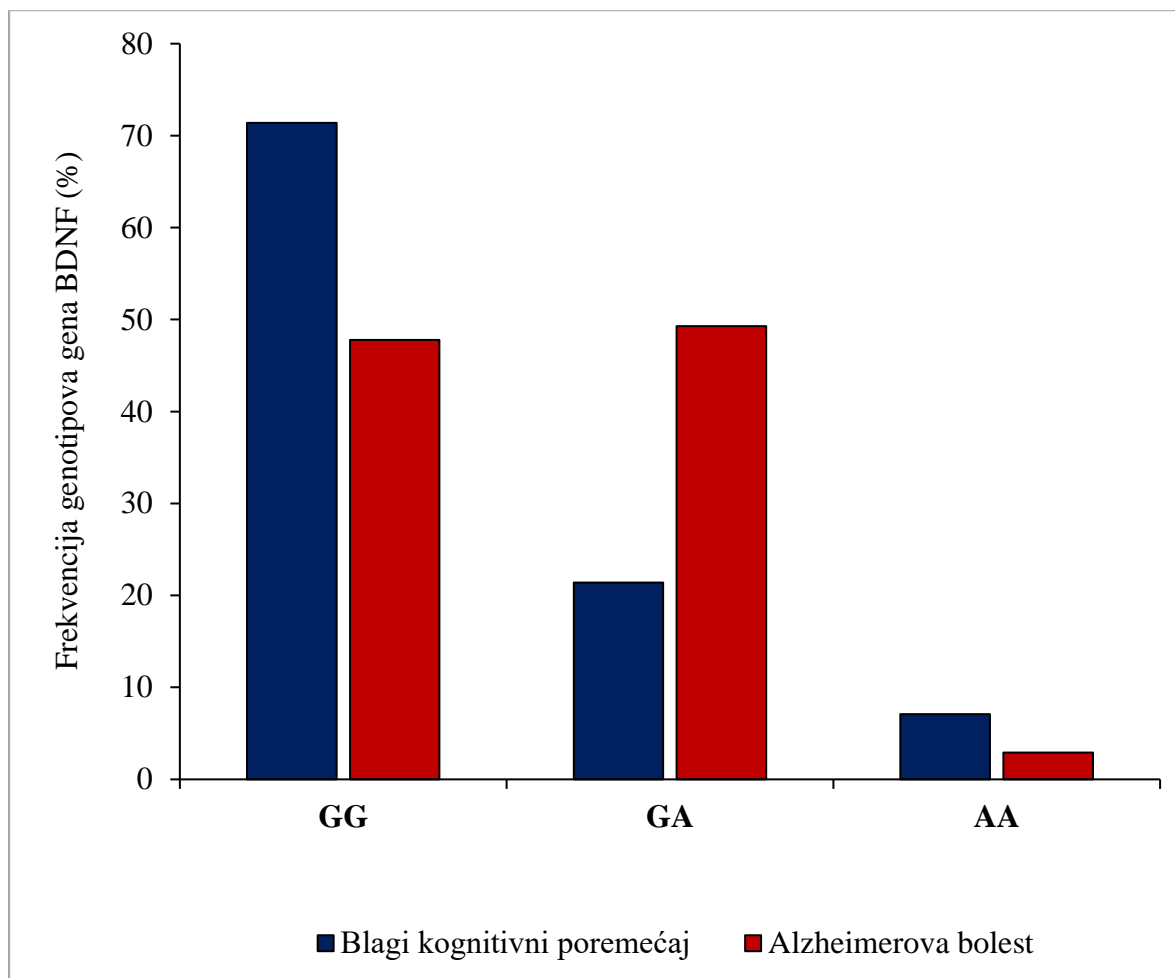
Za provjeru jesu li istraživani polimorfizmi gena *BDNF* u neravnoteži udruživanja (engl. *linkage disequilibrium*, LD), odnosno ukoliko se neke kombinacije alela (haplotipovi) češće od očekivanog nasljeđuju zajedno, korišten je računalni program Haploview, verzija 4.2 (Broad Institute of Harvard and MIT, SAD) (Barrett i sur., 2005). LD se opisuje standardiziranim koeficijentom  $D'$ . Vrijednost  $D'$  viša od 0,80 upućuje na to da su ispitivani polimorfizmi u LD-u. U ovom slučaju, istraživani polimorfizmi rs6265 i rs56164415 nisu u LD-u ( $D' = 0,33$ ), te su u daljnjim analizama obrađivani zasebno.



**Slika 9.** Prikaz analize neravnoteže udruživanja između polimorfizama rs6265 i rs56164415 gena *BDNF*. Vrijednost u kvadratu predstavlja vrijednost LD-a između parova polimorfizama (D').

#### 4.5.1. Povezanost polimorfizma rs6265 gena za moždani neurotrofni čimbenik s dijagnozom Alzheimerove bolesti

Korištenjem  $\chi^2$ -testa provjereno je postoji li značajna razlika u frekvenciji genotipova za polimorfizam rs6265 među podskupinama ispitanika podijeljenih prema dijagnozi. Distribuciju pojedinih genotipova za polimorfizam rs6265 u podskupinama ispitanika podijeljenih prema dijagnozi prikazuje [Slika 10](#). Zabilježena je značajna razlika u frekvenciji genotipova s obzirom na polimorfizam rs6265 između ispitanika oboljelih od AB-a i ispitanika s dijagnozom MCI-ja ( $\chi^2=13,42$   $df=2$ ;  $p=0,001$ ), što upućuje na povezanost polimorfizma rs6265 gena *BDNF* s dijagnozom AB-a ([Slika 10](#)).



**Slika 10.** Distribucija genotipova s obzirom na polimorfizam rs6265 gena *BDNF* kod ispitanika s blagim kognitivnim poremećajem (MCI) i ispitanika s dijagnozom Alzheimerove bolesti (AB).

Distribucija genotipova i alela za polimorfizam rs6265 gena *BDNF* kod svih ispitanika prikazana je u Tablici 14. Uspoređene su raspodjele svih skupina genotipova (AA vs. GA vs. GG) te nositelji alela A (heterozigoti GA i homozigoti AA) vs. homozigoti GG (Tablica 14). Zabilježena je statistički značajna razlika u raspodjeli genotipova i alela za polimorfizam rs6365 gena *BDNF* između podskupina bolesnika podijeljenih prema dijagnozi koja proizlazi iz značajno veće frekvencije heterozigota u skupini ispitanika oboljelih od AB-a (Tablica 14). Usporedbom frekvencije alela i nositelja alela A u odnosu na homozigote GG, primijećena je značajno viša učestalost alela A u ispitanika oboljelih od AB-a u odnosu na ispitanike s dijagnozom MCI-ja (Tablica 14), što upućuje na povezanost polimorfizma rs6265 gena *BDNF* i dijagnoze AB-a.

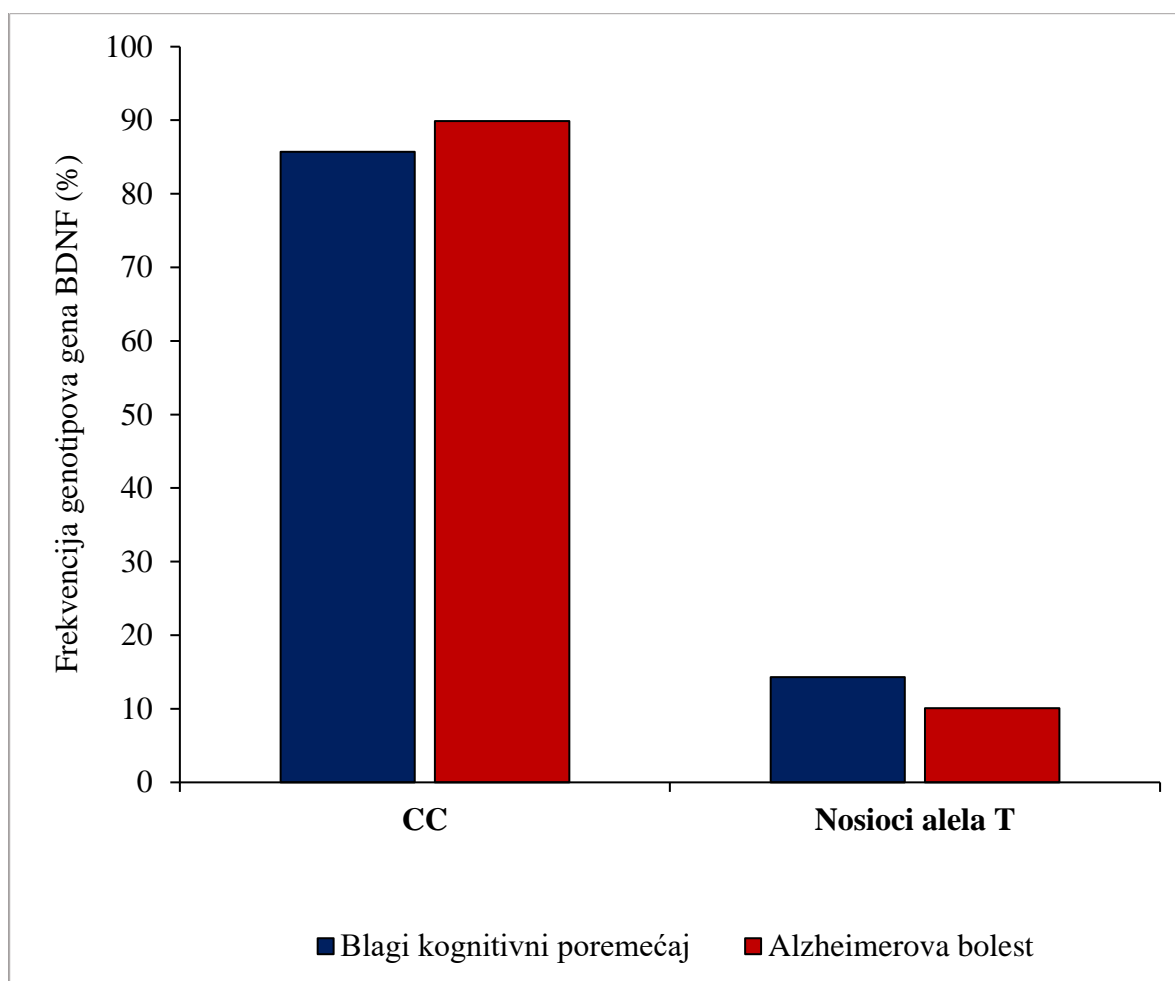
**Tablica 14.** Distribucija alela i genotipova s obzirom na polimorfizam rs6265 gena *BDNF* kod ispitanika s blagim kognitivnim poremećajem (MCI) i ispitanika s dijagnozom Alzheimerove bolesti (AB).

<i>BDNF</i> rs6265	Blagi kognitivni poremećaj	Alzheimerova bolest
<b>Genotip</b>	<b>N (%)</b>	<b>N (%)</b>
<b>AA</b>	6 (7,1)	2 (2,9)
<b>GA</b>	18 (21,4)	34 (49,3)
<b>GG</b>	60 (71,4)	33 (47,8)
<b><math>\chi^2</math>-test</b>	$\chi^2=13,42$ ; $df=2$ ; $p=0,001$	
<b>Genotip</b>	<b>N (%)</b>	<b>N (%)</b>
<b>Nositelji alela A</b>	24 (28,6)	36 (52,2)
<b>GG</b>	60 (71,4)	33 (47,8)
<b><math>\chi^2</math>-test</b>	$\chi^2=8,85$ ; $df=1$ ; $p=0,003$	
<b>Aleli</b>	<b>N (%)</b>	<b>N (%)</b>
<b>A</b>	30 (17,9)	38 (27,5)
<b>G</b>	138 (82,1)	100 (72,5)
<b><math>\chi^2</math>-test</b>	$\chi^2=4,11$ ; $df=1$ ; $p=0,043$	

*BDNF*, moždani neurotrofni čimbenik; N, broj ispitanika; SNP, polimorfizam jedne baze

#### 4.5.2. Povezanost polimorfizma rs56164415 gena za moždani neurotrofni čimbenik s dijagnozom Alzheimerove bolesti

Korištenjem  $\chi^2$ -testa provjereno je postoji li značajna razlika u frekvenciji genotipova za polimorfizam rs56164415 među podskupinama ispitanika podijeljenih prema dijagnozi. Distribuciju pojedinih genotipova za polimorfizam rs56164415 u podskupinama ispitanika podijeljenih prema dijagnozi prikazuje [Slika 11](#). Analizom frekvencije genotipova nije zabilježena značajna frekvencija genotipova polimorfizma rs56164415 između ispitanika oboljelih od AB-a i ispitanika s MCI-jem ( $\chi^2=0,60$   $df=1$ ;  $p=0,440$ ), što upućuje na nedostatak povezanosti polimorfizma rs56164415 gena *BDNF* s dijagnozom AB-a.



**Slika 11.** Distribucija genotipova s obzirom na polimorfizam rs56164415 gena *BDNF* kod ispitanika s blagim kognitivnim poremećajem (MCI) i ispitanika s dijagnozom Alzheimerove bolesti (AB).

Raspodjela genotipova i alela kod svih uključenih ispitanika s obzirom na polimorfizam rs56164415 prikazana je u [Tablici 15](#). Nije zabilježena značajna razlika u raspodjeli genotipova i alela za polimorfizam rs56164415 gena *BDNF* između podskupina ispitanika podijeljenih prema dijagnozi.

**Tablica 15.** Distribucija alela i genotipova s obzirom na polimorfizam rs56164415 gena *BDNF* kod ispitanika s blagim kognitivnim poremećajem (MCI) i ispitanika s dijagnozom Alzheimerove bolesti (AB).

<i>BDNF</i> rs56164415	Blagi kognitivni poremećaj	Alzheimerova bolest
Genotip	N (%)	N (%)
CC	71 (85,7)	62 (89,9)
Nositelji alela T	12 (14,3)	7 (10,1)



$\chi^2$ -test	$\chi^2=0,60$ ; df=1; p=0,440	
<b>Aleli</b>	<b>N (%)</b>	<b>N (%)</b>
<b>C</b>	153 (92,2)	130 (94,2)
<b>T</b>	13 (7,8)	8 (5,8)
$\chi^2$ -test	$\chi^2=0,49$ ; df=1; p=0,486	

BDNF, moždani neurotrofni čimbenik; N, broj ispitanika; SNP, polimorfizam jedne baze

#### 4.5.3. Polimorfizmi gena za moždani neurotrofni čimbenik i kognitivni simptomi demencije

U svim analizama korišteni su neparametrijski testovi za statističku obradu podataka s obzirom na odstupanja od normalne razdiobe dokazana Kolmogorov-Smirnovim testom. Povezanost ostvarenog broja bodova na pojedinim kognitivnim testovima i polimorfizama rs6265 i rs56164415 gena *BDNF* određena je kod svih ispitanika zajedno (N=153). Zbog malog broja ispitanika u podskupinama i činjenice da ne postoji značajna varijacija u ostvarenom broju bodova na kognitivnim testovima unutar skupine ispitanika s dijagnozom MCI-ja, dodatne analize nisu rađene za podskupinu ispitanika oboljelih od AB-a, nego za sve ispitanike zajedno. Za usporedbe je korišten Mann-Whitney U test.

Utjecaj genotipova s obzirom na polimorfizam rs6265 (homozigoti GG vs. nositelji alela A) i s obzirom na polimorfizam rs56164415 (homozigoti CC vs. nositelji alela T) gena *BDNF* na ostvareni broj bodova na MMSE testu ispitan je kod svih ispitanika zajedno (N=153) ([Tablica 16](#)). Zabilježena je značajna povezanost istraživanih polimorfizama s ostvarenim brojem bodova na MMSE testu kada se svi ispitanici promatraju zajedno. S obzirom na polimorfizam rs6265, kognitivne funkcije su značajno bolje očuvane kod homozigota GG (p=0,010), dok su u slučaju polimorfizma rs56164415 kognitivne funkcije značajno bolje očuvane kod nositelja alela T (p=0,014).

**Tablica 16.** Utjecaj genotipova s obzirom na polimorfizme gena *BDNF* na broj bodova na testu MMSE kod svih ispitanika zajedno (N=153). Svi podaci su prikazani kao medijan (raspon).

SNP	Genotip	MMSE	Mann-Whitney U test	
			U	p
rs6265 (Val66Met)	GG	26,0 (10,0-28,0)	3472,0	0,010

	<b>Nositelji alela A</b>	19,0 (10,0-28,0)		
<b>rs56164415 (C270T)</b>	<b>CC</b>	22,0 (10,0-28,0)	3411,5	0,014
	<b>Nositelji alela T</b>	27,0 (10,0-28,0)		

MMSE, Mini-mental test; SNP, polimorfizam jedne baze

Utjecaj genotipova s obzirom na polimorfizam rs6265 (homozigoti GG vs. nosioci alela A) i s obzirom na polimorfizam rs56164415 (homozigoti CC vs. nosioci alela T) gena *BDNF* na ostvareni broj bodova na CDT testu ispitan je kod svih ispitanika zajedno (N=153) (Tablica 17). Niti u slučaju polimorfizma rs6265 ( $p=0,368$ ) niti polimorfizma rs56164415 ( $p=0,451$ ) nije zabilježen značajan utjecaj pojedinih genotipova na ostvareni broj bodova na CDT testu kada se promatraju svi ispitanici zajedno.

**Tablica 17.** Utjecaj genotipova s obzirom na polimorfizme gena *BDNF* na broj bodova na testu crtanja sata kod svih ispitanika zajedno (N=153). Svi podaci su prikazani kao medijan (raspon).

SNP	Genotip	Test crtanja sata	Mann-Whitney U test	
			U	p
<b>rs6265 (Val66Met)</b>	<b>GG</b>	5,0 (0,0-50,)	1434,5	0,368
	<b>Nositelji alela A</b>	3,0 (0,0-5,0)		
<b>rs56164415 (C270T)</b>	<b>CC</b>	4,0 (0,0-5,0)	1402,0	0,451
	<b>Nositelji alela T</b>	5,0 (0,0-5,0)		

SNP, polimorfizam jedne baze

#### 4.6. Povezanost polimorfizama gena za moždani neurotrofni čimbenik s koncentracijom moždanog neurotrofnog čimbenika u plazmi

Povezanost istraživanih polimorfizama rs6265 i rs56164415 gena *BDNF* i koncentracije proteina *BDNF* u plazmi ispitanika oboljelih od AB-a i ispitanika s dijagnozom MCI-ja (N=153) analizirana je metodom dvosmjerne ANOVA-e procjenom odnosa između jedne

kontinuirane varijable (koncentracija BDNF-a u plazmi) i dvije nominalne varijable (dijagnoza i određeni polimorfizam). Uzimajući u obzir odstupanja od normalne razdiobe, za analizu pomoću dvosmjerne ANOVA-e korištene su transformirane vrijednosti koncentracije BDNF-a u plazmi, koje su logaritmiranjem ( $\lg_{10}$ ) zadovoljile preduvjet za korištenje parametrijske statistike.

Analiza nije pokazala značajan učinak polimorfizma rs6265 zasebno ( $p=0,499$ ), niti u kombinaciji s dijagnozom ( $p=0,223$ ), na vrijednosti koncentracije BDNF-a u plazmi ([Tablica 18](#)). Nadalje, polimorfizam rs56164415 zasebno ( $p=0,384$ ), ni i u kombinaciji s dijagnozom ( $p=0,895$ ), nema značajan učinak na vrijednosti koncentracije BDNF-a u plazmi ([Tablica 18](#)).

**Tablica 18.** Utjecaj polimorfizama rs6265 i rs56164415 gena *BDNF* na koncentraciju proteina BDNF u plazmi.

Polimorfizam gena <i>BDNF</i>	Utjecaj na koncentraciju proteina BDNF u plazmi (dvosmjerna ANOVA)								
	Dijagnoza			Polimorfizam			Dijagnoza x polimorfizam		
	F	df	p	F	df	p	F	df	p
rs6265	0,21	1	0,644	0,70	2	0,499	1,51	2	0,223
rs56164415	0,83	1	0,365	0,761	1	0,384	0,02	2	0,895

ANOVA, analiza varijance; BDNF, moždani neurotrofni čimbenik

#### 4.7. Povezanost polimorfizama gena za moždani neurotrofni čimbenik s relativnom ekspresijom gena za moždani neurotrofni čimbenik

Povezanost istraživanih polimorfizama rs6265 i rs56164415 gena *BDNF* i relativne ekspresije gena *BDNF* kod ispitanika oboljelih od AB-a i ispitanika s dijagnozom MCI-ja (N=153) analizirana je metodom dvosmjerne ANOVA-e procjenom odnosa između jedne kontinuirane varijable (relativna ekspresija gena *BDNF*) i dvije nominalne varijable (dijagnoza i određeni polimorfizam). Uzimajući u obzir odstupanja od normalne razdiobe, za analizu pomoću dvosmjerne ANOVA-e korištene su transformirane vrijednosti relativne ekspresije gena *BDNF*, koje su logaritmiranjem ( $\lg_{10}$ ) zadovoljile preduvjet za korištenje parametrijske statistike.

Analiza nije pokazala značajan učinak polimorfizma rs6265 zasebno ( $p=0,584$ ), niti u kombinaciji s dijagnozom ( $p=0,592$ ), na relativnu ekspresiju gena *BDNF* (Tablica 19). Isto tako, polimorfizam rs56164415 niti zasebno ( $p=0,999$ ), ni u kombinaciji s dijagnozom ( $p=0,798$ ) ne pokazuje značajan učinak na relativnu ekspresiju gena *BDNF* (Tablica 19).

**Tablica 19.** Utjecaj polimorfizama rs6265 i rs56164415 na relativnu ekspresiju gena *BDNF*.

Polimorfizam gena <i>BDNF</i>	Utjecaj na relativnu ekspresiju gena <i>BDNF</i> (dvosmjerna ANOVA)								
	Dijagnoza			Polimorfizam			Dijagnoza x polimorfizam		
	F	df	p	F	df	p	F	df	p
rs6265	3,50	1	0,064	0,54	2	0,584	0,53	2	0,592
rs56164415	5,58	1	0,019	0,00	1	0,999	0,07	2	0,798

ANOVA, analiza varijance; BDNF, moždani neurotrofni čimbenik

## 5. RASPRAVA

AB i druge demencije predstavljaju globalni javnozdravstveni problem koji uz sebe veže značajan emocionalni i ekonomski teret. Ranija detekcija i pravovremena terapijska intervencija omogućili bi usporavanje progresivnog tijeka bolesti. Upravo u tome leži klinički potencijal BDNF-a, koji se u kontekstu AB-a može promatrati kao periferni biomarker i kao terapijska meta.

U ovom radu zabilježeni su sljedeći rezultati: 1) viša koncentracija BDNF-a u plazmi u skupini ispitanika oboljelih od AB-a u odnosu na ispitanike s MCI-jem; 2) negativna korelacija između koncentracije BDNF-a u plazmi i ostvarenog broj bodova na psihometrijskim testovima; 3) smanjena relativna ekspresija gena *BDNF* u skupini ispitanika oboljelih od AB-a u odnosu na ispitanike s MCI-jem; 4) pozitivna korelacija između relativne ekspresije gena *BDNF* i razine kognitivnog oštećenja; 5) negativna korelacija između koncentracije BDNF-a u plazmi i relativne ekspresije gena *BDNF* u svih ispitanika; 6) viša učestalost alela A polimorfizma rs6265 gena *BDNF* u skupini ispitanika oboljelih od AB-a; te 7) značajno bolje očuvane kognitivne funkcije kod *BDNF* rs6265 homozigota GG, odnosno kod nosioca alela T u slučaju polimorfizma rs56164415.

Ispitanici su prema dijagnozi podijeljeni na oboljele od AB-a i one s dijagnozom MCI-ja. Općenito se MCI smatra prethodnikom AB-a, odnosno točkom loma u kojoj se bilježe kognitivna oštećenja različita od normalnog tijeka starenja. Time je očekivana dob u toj skupini ispitanika niža u odnosu na ispitanike oboljele od AB-a. Naravno, progresija MCI-ja u AB nije jednoznačno određena, ali očekivano je da ipak većina bolesnika s MCI-jem neće razviti AB. Rezultati velikog longitudinalnog ispitivanja Marcos i sur. pokazali su da je samo 15 % oboljelih od MCI-ja progrediralo u demenciju tijekom perioda praćenja od 4,5 god. (Marcos i sur., 2016).

Razlika u ostvarenom broju bodova na testovima MMSE i CDT u skladu je s očekivanjima uzimajući u obzir izraženije patološke promjene povezane s AB-om i njihov odraz na kognitivnu funkciju oboljelih osoba. Oba testa koriste se s ciljem procjene narušenosti kognitivnih funkcija, ali CDT je učinkovitiji od testa MMSE u identifikaciji osoba s narušenim izvršnim funkcijama (Samton i sur., 2005), odnosno onih čija je sposobnost za samostalno funkcioniranje narušena. Na taj način moguće je prepoznavanje osoba kojima su potrebne određene mjere skrbi. Prema Pernecky i sur., raspon ostvarenih bodova na MMSE testu od 0

- 10 odgovara uznapredovaloj, 11 - 20 umjerenoj demenciji, 21 - 25 blagoj demenciji, 26 - 29 upitnoj demenciji, a 30 je maksimalan broj bodova i odgovara zdravoj osobi (Pernecky i sur., 2006). Medijan rezultata MMSE testa skupine ispitanika s dijagnozom MCI-ja (27,0) prema tome odgovara upitnoj demenciji, a skupine oboljelih od AB-a (13,0) umjerenoj demenciji. Rezultat na testu CDT maksimalno može iznositi 5 bodova i u tom slučaju se radi o odsustvu kognitivnih deficita, a zabilježena razlika u ostvarenom broju bodova među podskupinama ispitanika pripisuje se izraženijem deficitu kognitivnih funkcija u ispitanika oboljelih od AB-a.

U ovom ispitivanju nije zabilježen utjecaj demografskih i kliničkih parametara na koncentraciju BDNF-a u plazmi. Što se tiče utjecaja spola i dobi na koncentraciju BDNF-a u plazmi, u ovom slučaju se radi o starijoj populaciji u kojoj je vrlo moguće da dob i spol nemaju više toliko značajan utjecaj na koncentraciju BDNF-a, ponajprije zbog manjeg utjecaja hormona. Unatoč tome što se skupine ispitanika značajno razlikuju prema dobi (medijan dobi ispitanika s MCI-je je 71 god., a ispitanika s AB-om 79 god.), činjenica je da su ispitanici u obje skupine stariji od 65 godina i da je u toj dobi potencijalni utjecaj dobi na fluktuacije u koncentraciji BDNF-a u plazmi zasigurno manji od utjecaja same dijagnoze. Neka istraživanja također su pokazala izostanak utjecaja dobi na koncentraciju BDNF-a (Angelucci i sur., 2010; Nettiksimmons i sur., 2014), a neka su zabilježila suprotne rezultate (Lang i sur. 2004, Erickson i sur., 2010). Istraživanje Lommatzsch i sur. na usporedivom broju ispitanika (N=140) pokazalo je značajan utjecaj dobi, spola i tjelesne mase na koncentraciju BDNF-a u plazmi, na način da ona opada s povećanjem tjelesne mase i dobi, te je značajno viša u žena u odnosu na muškarce, ali utjecaj spola se gubi nakon sparivanja prema tjelesnoj masi (Lommatzsch i sur., 2005). Međutim, uzimajući u obzir dob ispitanika u istraživanju Lommatzsch i sur., koja se kreće u rasponu od 20 do 60 godina starosti, njihovi rezultati dodatno potvrđuju da su u mlađoj populaciji fluktuacije u koncentraciji BDNF-a u plazmi izraženije nego nakon 65. godine života. Primijećene razlike u koncentraciji BDNF-a između muškaraca i žena pripisuju se djelovanju estrogena, koji može utjecati na ekspresiju BDNF-a i djelovati na iste mete (Scharfman i MacLusky, 2006). Međutim, u kasnijoj životnoj dobi, nakon menopauze, utjecaj estrogena na razinu BDNF-a trebao bi se smanjiti i time razlika među spolovima izgubiti.

Plazma bolje odražava razinu slobodnog BDNF-a od seruma (Gejl i sur., 2019) jer se izbjegava utjecaj trombocita na koncentraciju BDNF-a, koji se iz njih oslobađa tijekom procesa zgrušavanja. Izmjerene koncentracije BDNF-a u serumu su 100 puta veće u odnosu na one izmjerene u plazmi (Radka i sur., 1996). Osim toga, zabilježena je značajno niža koncentracija

BDNF-a u trombocitima u žena u odnosu na muškarce (Lommatzsch i sur., 2005), što potencijalno pridonosi zabilježenim različitim količinama BDNF-a na periferiji ovisno o spolu. Nadalje, BDNF se stvara u limfocitima, makrofagima i endotelnim stanicama, odnosno stanicama koje sudjeluju u upalnom odgovoru te ga aktivno sintetiziraju i glatke mišićne stanice te otpuštaju u cirkulaciju (Donovan MJ i sur., 1995; Nakahashi i sur., 2000). Neki autori povezuju povišenu koncentraciju BDNF-a u serumu s upalnim procesom prisutnim kod oboljelih od AB-a (Angelucci i sur., 2010). Jedna od hipoteza nastanka AB-a upravo je upalna hipoteza, a činjenica je da povećano stvaranje leukocita tijekom upale može utjecati na izmjerenu razinu BDNF-a u plazmi, čimbenik koji u ovom radu nije zasebno razmatran. Koncentracija BDNF-a u plazmi stabilna je tijekom 6 mjeseci pohranom uzoraka na -20 °C ili -80 °C, nakon čega raste bez obzira na korišteni antikoagulans, najvjerojatnije zbog djelomične ili potpune degranulacije preostalih trombocita u uzorku (Wessels i sur., 2020). Osim određivanja iz plazme, prednost ovog ispitivanja je korištenje komercijalnog kompleta Total BDNF Quantikine® ELISA Kit tvrtke R&D Systems, Inc. (SAD) koji je specifičan za mBDNF.

U istraživanju Lommatzsch i sur. na zdravim dobrovoljcima (N=140, dob 20 – 60 godina) zabilježena je koncentracija BDNF-a u plazmi u rasponu od 8 do 927 pg/ml, s medijanom od 92,5 pg/ml (Lommatzsch i sur., 2005). Takav raspon upućuje na značajnu interindividualnu varijaciju u koncentraciji BDNF-a. Prema tome, izmjerene koncentracije BDNF-a nalaze se unutar i iznad navedenog raspona, sa značajno višim koncentracijama u skupini ispitanika oboljelih od AB-a u odnosu na ispitanike s dijagnozom MCI-ja. Zabilježena razlika u koncentraciji upućuje na potencijalno postojanje kompenzatornih mehanizama pojačanog otpuštanja BDNF-a u ranijim stadijima bolesti. Nikolac Perković i sur. su također zabilježili značajno višu koncentraciju BDNF-a u plazmi ispitanika oboljelih od AB-a u odnosu na ispitanike s dijagnozom MCI-ja (Nicolac Perković i sur., 2023). U istraživanju Laske i sur. zabilježena je povišena koncentracija BDNF-a u ranom stadiju AB-a, a snižena u uznapređovaloj bolesti (Laske i sur., 2006). Takav tijek može se objasniti iscrpljivanjem kompenzatornih mehanizama koji organizam nastoji ukloniti nastala oštećenja ili nakupljanjem BDNF-a zbog neučinkovitog transporta u aksonima (Angelucci i sur., 2010; ).

Rezultati uspoređivanja koncentracije perifernog BDNF-a između ispitanika oboljelih od AB-a i ispitanika s dijagnozom MCI-ja ili zdravih kontrola dostupni u literaturi su raznoliki. U nekim ispitivanjima nije zabilježena značajna razlika u koncentraciji BDNF-a u oboljelih od AB-a u odnosu na uspoređivanu skupinu, dok su u drugima zabilježene i povišene i snižene

koncentracije BDNF-a. Qin i sur. su u velikoj meta-analizi zabilježili značajno snižene vrijednosti BDNF-a u perifernoj krvi u oboljelih od AB-a u odnosu na zdrave ispitanike, uz trend snižene koncentracije BDNF-a u kod oboljelih u MCI stadiju u odnosu na zdrave ispitanike, ali razlika između skupina oboljelih s MCI-om i s AB-om nije zabilježena (Qin i sur., 2017). S druge strane, meta-analiza Kim i sur. nije pokazala statistički značajnu razliku u koncentraciji BDNF-a između oboljelih od AB-a i MCI-a u odnosu na zdrave ispitanike, ali je pokazala da je razina perifernog BDNF-a povišena u ranom stadiju AB-a, a snižena u kasnijim stadijima u bolesnika s lošijim rezultatima MMSE testa (Kim i sur., 2017).

Zabilježena negativna korelacija između ostvarenog broja bodova na testovima za procjenu narušenosti kognitivnih funkcija i koncentracije BDNF-a u plazmi ispitanika suprotna je očekivanom odnosu navedenih varijabli. Takav trend zabilježena je i u istraživanju Nikolac Perkovic i sur., upućujući na veću koncentraciju BDNF-a u plazmi u ispitanika s narušenijim kognitivnim funkcijama (Nicolac Perkovic i sur., 2023). Nadalje, Nikolac Perkovic i sur. ispitanike su podijelili na temelju ostvarenog broja bodova na MMSE testu na one s normalnom kognitivnom funkcijom, blagom demecijom, umjerenom demencijom i uznapredovalom demecijom. Zabilježili su značajno više koncentracije BDNF-a u plazmi ispitanika s umjerenom i blagom demecijom u odnosu na one s normalnim kognitivnim sposobnostima, a taj trend zabilježen je i u skupini ispitanika s uznapredovalom demecijom, ali bez statističke značajnosti (Nicolac Perkovic i sur., 2023). U velikom opservacijskom ispitivanju Shimada i sur. (N=4463) niža koncentracija BDNF-a povezana je s lošijim rezultatima na testovima za procjenu kognitivnih funkcija (Shimada i sur., 2014). Nadalje, Laske i sur. pokazali su da je niža koncentracija BDNF-a povezana s bržim propadanjem kognitivnih funkcija u ispitanika oboljelih od AB-a, zabilježenim kao promjena ostvarenog broja bodova na MMSE testu >4 godišnje (Laske i sur., 2011). Navedeni rezultati upućuju na to da periferna koncentracija BDNF-a ipak može odražavati suptilne razlike u kognitivnim sposobnostima.

Usporedbom relativne ekspresije gena *BDNF* između ispitanika oboljelih od AB-a i ispitanika s dijagnozom MCI-ja zabilježena je statistički značajna razlika koja proizlazi is smanjene ekspresije gena *BDNF* u skupini ispitanika oboljelih od AB-a. Dakle, u ovom radu pokazana je veća koncentracija BDNF-a u kombinaciji sa smanjenom razinom mRNA u plazmi ispitanika oboljelih od AB-a u odnosu na ispitanike s dijagnozom MCI-ja. Naizgled kontradiktorni rezultati upućuju na složenost mehanizama kontrole homeostaze BDNF-a u organizmu koji još nisu rasvijetljeni. Moguće je da se, ovisno o stadiju bolesti, radi o kompenzatornim



mehanizmima otpuštanja prethodno sintetiziranog BDNF-a, kada stanične zalihe još nisu iscrpljene, a ekspresija mRNA ipak je snižena. Naime, ekspresija gena *BDNF* mjerena je isključivo u leukocitima, a koncentracija na razini proteina mjerena je u plazmi. Kao što je već rečeno, BDNF koji se nalazi u plazmi podrijetlom je iz leukocita, međutim, BDNF u plazmi podrijetlom je iz epitelnih stanica, glatkih mišićnih stanica te trombocita. Nadalje, zabilježena je značajna pozitivna korelacija između ekspresije gena *BDNF* i otvorenog broja bodova na testovima za procjenu kognitivnih funkcija, na način da je viša razina ekspresije gena *BDNF* povezana s boljim kognitivnim funkcioniranjem. Smanjena ekspresija gena *BDNF* povezana je s nakupljanjem A $\beta$  i stvaranjem amiloidnih plakova, tau fosforilacijom, odumiranjem neurona i upalom (Wang i sur., 2019). Osim u AB-u, snižena razina ukupne *BDNF* mRNA zabilježena je u psihijatrijskim bolestima poput depresije i shizofrenije (Cattaneo i sur., 2010; Weickert i sur., 2003; Green i sur., 2011). Ekspresija *BDNF*-a pod utjecajem je različitih podražaja, a djelovanjem transkripcijskih čimbenika na promotorska mjesta nastaju različiti transkripti čiji se odnos može kvantitativno analizirati. Osim toga, u ovom radu zabilježena je negativna korelacija između koncentracije BDNF-a u plazmi i relativne ekspresije gena *BDNF* kod svih ispitanika zajedno i u podskupini ispitanika s dijagnozom MCI-ja. Taj trend se gubi u podskupini ispitanika oboljelih od AB-a. Rezultati dostupni u literaturi o povezanosti koncentracije BDNF-a i ekspresije gena *BDNF* su raznoliki. Koncentracija BDNF-a određena je iz plazme, a ekspresija određivanjem mRNA iz stanica periferne krvi, primarno iz leukocita. Ekspresija gena *BDNF* u leukocitima može biti pod utjecajem raznih čimbenika, poput upale i kroničnih bolesti, koji nisu posebno razmatrani u okviru ovog istraživanja. Odnos koncentracije i ekspresije *BDNF*-a nije do kraja razjašnjen, a upravo analiza transkriptoma i regulacije BDNF-a na razini mRNA mogla bi dati jasniju sliku o zbivanjima u stanju bolesti.

U ovom radu promatrana su dva polimorfizma gena *BDNF* (rs6265 i rs56164415), odnosno njihova povezanost s dijagnozom AB-a, razinom kognitivnog oštećenja i potencijalni utjecaj na ekspresiju gena *BDNF* i koncentraciju BDNF-a u uzorcima plazme. To su ujedno i najčešće istraživani polimorfizmi gena *BDNF*. Polimorfizam rs6265 je funkcionalni polimorfizam koji ima ulogu u transportu i izlučivanju BDNF-a. Ispitanici su prema genotipu podijeljeni na homozigote GG i nosioce alela A. Promatranjem genotipova za polimorfizam rs6265 gena *BDNF*, zabilježena je značajno viša učestalost alela A u ispitanika oboljelih od AB-a u odnosu na ispitanike s MCI-jem. Nadalje, prema rezultatima testa MMSE, kognitivne funkcije su značajno bolje očuvane kod homozigota GG s obzirom na polimorfizam rs6265 gena *BDNF*. Time se alel A može smatrati rizičnim alelom za razvoj AB-a. Zabilježena frekvencija alela A

u hrvatskoj populaciji iznosi 19,5 %, što je u skladu s rezultatima zabilježenim i za druge europske populacije (Pivac i sur., 2009). U usporedbi s europskom, frekvencija alela A značajno je viša u afričkoj, a niža u azijskoj populaciji (Vulturar i sur., 2016). Uzimajući u obzir frekvenciju alela A u populaciji, polimorfizam rs6265 opravdano je privukao pažnju znanstvene zajednice. Dosadašnja ispitivanja nisu povezala mutacije u genu *BDNF* s rizikom od razvoja AB-a. Međutim, polimorfizam rs6265 povezan je s višim koncentracijama ukupnog i fosforiliranog tau proteina (Lim i sur. 2016), s bržim propadanjem kognitivnih sposobnosti i većim stupnjem atrofije hipokampusa (Cechova i sur., 2020), te s većim stupnjem konverzije iz MCI-ja u AB kod nosioca alela A (Xie i sur., 2017). Bolesnici s dijagnozom MCI-ja koji su nositelji i APOE  $\epsilon$ 4 i alela A imaju izraženije deficite u pamćenju (Cechova i sur., 2020), što upućuje na značajnost genetičkih čimbenika pri razmatranju rizika od razvoja i terapijskog djelovanja u kontekstu AB-a.

Polimorfizam rs56164415 se nalazi u nekodirajućoj regiji eksona V gena *BDNF* i potencijalno utječe na njegovu ekspresiju. U ovom ispitivanju nije zabilježena značajna razlika u frekvenciji genotipova polimorfizma rs56164415 između ispitanika oboljelih od AB-a i ispitanika s dijagnozom MCI-ja. Međutim, prema rezultatima testa MMSE, kognitivne funkcije su značajno bolje očuvane kod nositelja alela T. Ovo je zanimljiv rezultat uzimajući u obzir prijašnja istraživanja koja su identificirala alel T kao rizičan i povezala ga s razvojem oblika bolesti s kasnim nastupom. U istraživanju Riemenschneidera i sur. zabilježena je značajno viša frekvencija alela T u ispitanika oboljelih od AB-a u odnosu na kognitivno zdrave kontrolne ispitanika, a pripadajući rizik od razvoja AB-a bio je još izraženiji u ispitanika nositelja alela T, ali bez APOE  $\epsilon$ 4 alela (Riemenschneider i sur., 2002). Osim navedenog ispitivanja iz Njemačke, isti rezultat pokazalo je ispitivanje na japanskoj populaciji, s 3,8 puta većim rizikom od razvoja AB-a u nosioca alela T u odnosu na one bez rizičnog alela (Kunugi i sur., 2001). S druge strane, Nishimura i sur. nisu zabilježili povezanost polimorfizma rs56164415 s razvojem AB-a s kasnim nastupom u ispitivanju na brazilskoj populaciji (Nishimura i sur., 2004).

Nadalje, u ovom ispitivanju promatrana je povezanost polimorfizama rs6265 i rs56164415 gena *BDNF*, zasebno i u kombinaciji s dijagnozom, s koncentracijom proteina BDNF-a u plazmi ispitanika, te s relativnom ekspresijom gena *BDNF*. Nije zabilježen značajan učinak polimorfizama rs6265 i rs56164415 gena *BDNF* na koncentraciju BDNF-a u plazmi, niti na relativnu ekspresiju gena *BDNF*. Međutim, u istraživanju Moreno i sur. zabilježen je utjecaj polimorfizma rs6265 na ekspresiju gena *BDNF*, na način da su niže razine mRNA u krvi

povezane s alelom A, a ekspresija je bila u korelaciji s upalnim biljezima (Moreno i sur., 2023), što dodatno potvrđuje ulogu upale u razvoju neurodegenerativnih bolesti. Nadalje, u istraživanju Gomes de Assis i sur. zabilježena je smanjena ekspresija gena *BDNF* kod nositelja alela A u odnosu na polimorfizam rs6265 nakon izlaganja metaboličkom stresu (Gomes de Assis i sur., 2021), ukazujući time na potencijalnu ulogu polimorfizma rs6265 u razvoju poremećaja povezanih sa stresom, uključujući neurološke bolesti. Osim promjena na razini nukleotida, epigenetički mehanizmi poput metilacije DNA, modifikacije histona i regulacije nekodirajućih RNA također igraju važnu ulogu u patologiji AB-a (Chouliaras i sur., 2010).

Rezultati ovog rada su u suglasnosti s dijelom publiciranih rezultata, dok su u suprotnosti s drugima, te odražavaju oprečnost dostupne literature o navedenoj temi. Dosada objavljeni rezultati istraživanja o povezanosti *BDNF*-a i AB-a su raznoliki. Neki od mogućih uzroka su heterogenost ispitivane populacije i manjak standardizacije, bilo u vrsti korištenog uzorka, bilo u metodi određivanja *BDNF*-a. Nedostaci ovog rada su presječni dizajn istraživanja, relativno mali broj uključenih ispitanika i nedostatak zdravih kontrolnih ispitanika usklađenih po dobi. Osigurati dovoljno veliku kontrolnu skupinu zdravih ispitanika je u ovakvoj vrsti ispitivanja poseban izazov uzimajući u obzir dob ispitanika. Buduća istraživanja imala bi korist od longitudinalnog promatranja većeg broja oboljelih ispitanika, ispitanika s povećanim rizikom od razvoja bolesti, te zdravih ispitanika usklađenih po dobi, kako bi se dobila jasnija slika o varijacijama u koncentraciji i ekspresiji *BDNF*-a usporedno s kliničkim tijekom same bolesti te potencijalno identificirale točke intervencije s ciljem preventivnog ili terapijskog djelovanja na temelju *BDNF*-a, kao biomarkera ili kao terapijske mete.

Zaključno, u ovom radu zabilježena je viša koncentracija *BDNF*-a u plazmi ispitanika oboljelih od AB-a u odnosu na ispitanika s MCI-jem, te negativna korelacija između koncentracije *BDNF*-a u plazmi i ostvarenog broja bodova na psihometrijskim testovima, što upućuje na moguće kompenzatorne mehanizme. Nadalje, promatranjem polimorfizama gena *BDNF*, zabilježena je viša učestalost alela A, s obzirom na polimorfizam rs6265, u skupini ispitanika oboljelih od AB-a. Značajno bolje očuvane kognitivne funkcije zabilježene su kod homozigota GG s obzirom na polimorfizam rs6265, odnosno kod nositelja alela T u slučaju polimorfizma rs56164415, što upućuje na postojanje rizičnih alela za navedene polimorfizme i time daje uvid u nasljednu komponentu bolesti.

## 6. ZAKLJUČCI

- Analizom koncentracije BDNF-a u plazmi ispitanika oboljelih od AB-a i ispitanika s dijagnozom MCI-ja zabilježena je viša koncentracija BDNF-a u plazmi u skupini ispitanika oboljelih od AB-a u odnosu na ispitanike s MCI-jem.
- Zabilježena je negativna korelacija između koncentracije BDNF-a u plazmi i ostvarenog broja bodova na psihometrijskim testova, na način da je viša koncentracija BDNF-a u plazmi ispitanika povezana s narušenijim kognitivnim funkcijama.
- Smanjena ekspresija gena *BDNF*, zajedno s višom koncentracijom BDNF-a u plazmi, kod ispitanika s AB-om u odnosu na one s MCI-jem, upućuje na postojanje kompenzatornih mehanizama.
- Zabilježena je pozitivna korelacija između relativne ekspresije gena *BDNF* i razine kognitivnog oštećenja, na način da je viša razina ekspresije gena *BDNF* povezana s boljim kognitivnim funkcioniranjem.
- Zabilježena je negativna korelacija između koncentracije BDNF-a u plazmi i relativne ekspresije gena *BDNF* u svih ispitanika i u podskupini ispitanika s MCI-jem, ali taj trend se gubi u podskupini ispitanika s AB-om.
- Nije zabilježen značajan učinak polimorfizama rs6265 i rs56164415 gena *BDNF* na koncentraciju BDNF-a u plazmi, niti na relativnu ekspresiju gena *BDNF*.
- Genotipizacijom dvaju najčešće istraživanih polimorfizama gena *BDNF*, zabilježena je viša učestalost alela A polimorfizma rs6265 gena *BDNF* u skupini ispitanika oboljelih od AB-a te značajno bolje očuvane kognitivne funkcije kod BDNF rs6265 homozigota GG, odnosno kod nositelja alela T u slučaju polimorfizma rs56164415, što upućuje na postojanje rizičnih alela za navedene polimorfizme i time daje uvid u nasljednu komponentu bolesti.

## 7. POPIS KRATICA

6-FAM – 6-karboksifluorescein

AAV2 - adeno-asocirani virusni vektor (serotip 2)

AB – Alzheimerova bolest

ACD – antikoagulans koji sadrži limunsku kiselinu, natrijev citrat i dekstrozu (engl. *acid citrat dextrose*)

AD7c-NTP - protein neuralnih niti povezan s AB-om (engl. *AD-associated neuronal thread protein*)

ADI - Međunarodno udruženje za Alzheimerovu bolest (engl. *Alzheimer's Disease International*)

ANOVA – analiza varijance (engl. *analysis of variance*)

ApoE – apolipoprotein E

APP – prekursor proteina amiloida-beta (engl. *amyloid-beta precursor protein*)

A $\beta$  – amiloid-beta

BDNF – moždani neurotrofni čimbenik (engl. *brain-derived neurotrophic factor*)

CaRF – transkripcijski čimbenik osjetljiv na kalcij (engl. *calcium responsive transcription factor*)

CD36 – diferencijacijski antigen 36 (engl. *cluster of differentiation 36*)

cDNA – komplementarna DNA (engl. *complementary DNA*)

CDT – Test crtanja sata (engl. *clock drawing test*)

COMT – katehol-O-metiltransferaza

CREB – protein koji veže element odgovora na cAMP (engl. *cyclic AMP response element-binding protein*)

Ct - broj ciklusa u kojem fluorescentni signal prijeđe prag detekcije fluorescencije (engl. *threshold cycle*)

CT – kompjuterizirana tomografija (engl. *computed tomography*)

DAG - diacilglicerol

deH<sub>2</sub>O – destilirana voda

DNA – deoksiribonukleinska kiselina (engl. *deoxyribonucleic acid*)

DSM – Dijagnostički i statistički priručnik mentalnih poremećaja (engl. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*)

ELISA – enzimski imunosorbentni test (engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*)

ERK - kinaza regulirana izvanstaničnim signalom (engl. *extracellular signal-regulated kinase*)

FDG - fluorodeoksiglukoza

GABA -  $\gamma$ -aminomaslačna kiselina (engl.  *$\gamma$ -aminobutyric acid*)

GAPDH - gliceraldehid-3-fosfat-dehidrogenaza (engl. *glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*)

Grb-2 – protein vezan na receptor čimbenika rasta 2 (engl. *growth factor receptor-bound protein 2*)

GDP - gvanozin-difosfat (engl. *guanosine diphosphate*)

GEF - čimbenikom zamjene gvaninskih nukleotida (engl. *guanine nucleotide exchange factor*)

GFAP - glijalni fibrilarni kiseli protein (engl. *glial fibrillary acidic protein*)

GLP-1 - glukagonu sličan peptid-1 (engl. *glucagon-like peptide-1*)

GTP – gvanozin-trifosfat (engl. *guanosine triphosphate*)

HDL - lipoproteini velike gustoće (engl. *high-density lipoproteins*)

HRP - peroksidaza iz hrena (engl. *horseradish peroxidase*)

HWE - Hardy-Weinbergova ravnoteža (engl. *The Hardy-Weinberg Equilibrium*)

IP3 - inozitol-1,4,5-trifosfat (engl. *inositol-1,4,5-trisphosphate*)

ITM – indeks tjelesne mase

LD - neravnoteža udruživanja (engl. *linkage disequilibrium*)

LDL - lipoproteini male gustoće (engl. *low-density lipoproteins*)

LTD - dugoročna depresija (engl. *long-term depression*)

LTP - dugoročno potenciranje (engl. *long-term potentiation*)

MAPK - proteinska kinaza aktivirana mitogenima (engl. *mitogen-activated protein kinase*)

MCI – blagi kognitivni (spoznajni) poremećaj (engl. *mild cognitive impairment*)

MEK - proteinska kinaza kinaze aktivirane mitogenom (engl. *mitogen-activated protein kinase kinase*)

Met – metionin

miRNA – mikro RNA

MKB – Međunarodna klasifikacija bolesti

MMSE – Mini-mental test (engl. *Mini Mental State Examination*)

mNCD – blagi neurokognitivni poremećaj (engl. *minor neurocognitive disorder*)

MoCA - Montrealska ljestvica procjene kognitivnih sposobnosti (engl. *Montreal Cognitive Assessment*)

MR – magnetska rezonancija

mRNA – glasnička RNA (engl. *messenger RNA*)

NF- $\kappa$ B – jezgrin čimbenik kappa B (engl. *nuclear factor kappa B*)

NfL - laki lanac neurofilamenta (engl. *neurofilament light chain*)

NFQ - nefluorescentni prigušivač (engl. *nonfluorescent quencher*)

NGF - čimbenik rasta živaca (engl. *nerve growth factor*)

NIA-AA - Nacionalni institut za starenje Sjedinjenih Američki Država i Udruženje za Alzheimerovu bolest (engl. *National Institute on Aging and Alzheimer's Association*)

NLRP3 - NLR receptor koji sadrži N-terminalnu pirinsku domenu tipa 3 (engl. *NOD-like 63 receptor pyrin 3*)

NOD - domena za vezanje i oligomerizaciju nukleotida (engl. *nucleotide-binding oligomerization domain*)

NMDA – N-metil-D-aspartat

NT3 – neurotrofin-3

NT4 – neurotrofin-4

p75<sup>NTR</sup> – neurotrofinski receptor molekularne mase 75 kDa

PDGF - čimbenik rasta trombocitnog porijekla (engl. *platelet-derived growth factor*)

PET - pozitronska emisijska tomografija

PI3K - fosfatidilinozilol-3-kinaza (engl. *phosphatidylinositol 3-kinase*)

PIP2 - fosfatidilinozilol-4,5-bisfosfat (engl. *phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate*)

PKC – protein kinaza C

PLC $\gamma$  – fosfolipaza C gama (engl. *phospholipase C gamma*)

PS1 – presenilin 1

PS2 – presenilin 2

p-tau – fosforilirani tau

qPCR – kvantitativni PCR (engl. *quantitative PCR*)

Raf – kinaza povezana s rapidnim ubrzavanjem fibrosarkoma (engl. *rapidly accelerated fibrosarcoma*)

Ras – protein povezan s virusom štakorskog sarkoma (engl. *rat sarcoma virus*)

RCLB - pufer za liziranje eritrocita (engl. *red cell lysis buffer*)

RH – Republika Hrvatska

Rho – Ras homologni proteini (engl. *Ras homologous*)

RNA – ribonukleinska kiselina (engl. *ribonucleic acid*)

RNaza - ribonukleaza

r<sub>s</sub> - Spearmanov koeficijent korelacije

SAD – Sjedinjene Američke Države

SDS - natrijev dodecil sulfat (engl. *sodium dodecyl sulfate*)

SH-2 – strukturno očuvana domena unutar Src onkoproteina (engl. *Src homology 2*)

SNP – polimorfizam jedne baze (engl. *single nucleotide polymorphism*)

SZO – Svjetska zdravstvena organizacija (engl. *World Health Organization*, WHO)

SŽS – središnji žičani sustav

TE – Tris-EDTA

TGF- $\beta$  - transformirajući čimbenik rasta beta (engl. *transforming growth factor beta*)

TLR – receptor sličan Toll-u (engl. *Toll-like receptor-4*)

Trk – tropomiozinska receptorska kinaza

t-tau – ukupni tau

Val – valin

VIC - 2'-kloro-7'-fenil-1,4-dikloro-6-karboksifluorescein



## 8. LITERATURA

American Psychiatric Association. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fifth Edition (DSM-5), American Psychiatric Association, Arlington, VA 2013.

Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics*. 2005 Jan 15;21(2):263-5.

Bateman RJ, Aisen PS, De Strooper B, Fox NC, Lemere CA, Ringman JM, Salloway S, Sperling RA, Windisch M, Xiong C (2011) Autosomal-dominant Alzheimer's disease: A review and proposal for the prevention of Alzheimer's disease. *Alzheimers Res Ther*. 2011; 3(1): 1.

Bateman RJ, Xiong C, Benzinger TLS, Fagan AM, Goate A, Fox NC, Marcus DS, Cairns NJ, Xie X, Blazey TM, Holtzman DM, Santacruz A, Buckels V, Oliver A, Moulder K, Aisen PS, Ghetti B, Klunk WE, McDade E, Martins RN, Masters CL, Mayeux R, Ringman JM, Rossor MN, Schofield PR, Sperling RA, Salloway S, Morris JC, and for the Dominantly Inherited Alzheimer Network. Clinical and Biomarker Changes in Dominantly Inherited Alzheimer's Disease. *N Engl J Med*. 2012 August 30; 367(9): 795–804.

Blennow K, de Leon MJ, Zetterberg H. Alzheimer's disease. *Lancet*. 2006 Jul 29;368(9533):387-403. doi: 10.1016/S0140-6736(06)69113-7.

Borroni B, Costanzi C, Padovani A. Genetic susceptibility to behavioural and psychological symptoms in Alzheimer disease. *Curr Alzheimer Res* 2010;7:158–64.

Cattaneo A, Bocchio-Chiavetto L, Zanardini R, Milanese E, Placentino A, Gennarelli M . Reduced peripheral brain-derived neurotrophic factor mRNA levels are normalized by antidepressant treatment. *Int J Neuropsychopharmacol* 2010;13:103–108.

Cechova K, Andel R, Angelucci F, Chmatalova Z, Markova H, Laczó J, et al. Impact of APOE and BDNF Val66Met gene polymorphisms on cognitive functions in patients with amnesic mild cognitive impairment. *J Alzheimer Dis*. 2020;73:247–57.

Chen TT, Lan TH, Yang FY. Low-intensity pulsed ultrasound attenuates LPS-induced neuroinflammation and memory impairment by modulation of TLR4/NF- $\kappa$ B signaling and CREB/BDNF expression. *Cereb Cortex*. 2019;29(4):1430–8.

Chen ZY, Ieraci A, Teng H, Dall H, Meng CX, Herrera DG, et al. Sortilin controls intracellular sorting of brain-derived neurotrophic factor to the regulated secretory pathway. *J Neurosci*. 2005;25(26):6156–66.

Chiaruttini C, Vicario A, Li Z, Baj G, Braiuca P, Wu Y, et al. Dendritic trafficking of BDNF mRNA is mediated by translin and blocked by the G196A (Val66Met) mutation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009;106(38):16481–6.

Cockrell JR, Folstein MF. Mini-Mental State Examination (MMSE). *Psychopharmacol Bull*. 1988;24(4):689-92.

Colucci-D'Amato L, Speranza L, Volpicelli F. Neurotrophic Factor BDNF, Physiological Functions and Therapeutic Potential in Depression, Neurodegeneration and Brain Cancer. *Int J Mol Sci*. 2020 Oct 21;21(20):7777.

Cummings J, Apostolova L, Rabinovici GD, Atri A, Aisen P, Greenberg S, Hendrix S, Selkoe D, Weiner M, Petersen RC, Salloway S. Lecanemab: Appropriate Use Recommendations. *J Prev Alzheimers Dis*. 2023;10(3):362-377.

de Assis GG, Hoffman JR, Bojakowski J, Murawska-Ciałowicz E, Ciężczyk P, Gasanov EV. The Val66 and Met66 Alleles-Specific Expression of BDNF in Human Muscle and Their Metabolic Responsivity. *Front Mol Neurosci*. 2021 May 5;14:638176.

Donovan MJ, Miranda RC, Kraemer R, McCaffrey TA, Tessarollo L, Mahadeo D, et al. Neurotrophin and neurotrophin receptors in vascular smooth muscle cells. Regulation of expression in response to injury. *American Journal of Pathology*. 1995;147:309–324.

Du H, Meng X, Yao Y, Xu J. The mechanism and efficacy of GLP-1 receptor agonists in the treatment of Alzheimer's disease. *Front. Endocrinol*. 2022;13:1033479.

Durany N, Michel T, Kurt J, Cruz-Sánchez FF, Cervás-Navarro J, Riederer P. Brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 levels in Alzheimer's disease brains. *Int J Dev Neurosci*. 2000 Dec;18(8):807-13.

Elliott E, Atlas R, Lange A, Ginzburg I. Brain-derived neurotrophic factor induces a rapid dephosphorylation of tau protein through a PI-3 Kinase signalling mechanism. *Eur J Neurosci*. 2005 Sep;22(5):1081-9.

Engelborghs S, Niemantsverdriet E, Struyfs H, Blennow K, Brouns R, Comabella M, Dujmovic I, van der Flier W, Frolich L, Galimberti D, Gnanapavan S, Hemmer B, Hoff E, Hort J, Iacobaeus E, Ingelsson M, de Jong FJ, Jonsson M, Khalil M, Kuhle J, Lleo A, de Mendonca A, Molinuevo JL, Nagels G, Paquet C, Parnetti L, Roks G, Rosa-Neto P, Scheltens P, Skarsgard C, Stomrud E, Tumani H, Jelle Visser P, Wallin A, Winblad B, Zetterberg H, Duits F, Teunissen CE. Consensus guidelines for lumbar puncture in patients with neurological diseases. *Alzheimers Dement (Amst)*. 2017 May 18;8:111-126.

Fahnestock M, Garzon D, Holsinger RMD, Michalski B. Neurotrophic factors and Alzheimer's disease: are we focusing on the wrong molecule? *J Neural Transm Suppl*. 2002;(62):241-52.

Falk N, Cole A, Meredith TJ. Evaluation of Suspected Dementia. *Am Fam Physician*. 2018;97(6):398-405.

Farrer LA, Cupples LA, Haines JL, Hyman B, Kukull WA, Mayeux R et al. Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease. A meta-analysis. APOE and Alzheimer Disease Meta Analysis Consortium. *JAMA* 1997;278:1349-56.

Fernandes BS, Berk M, Turck CW, Steiner J, Goncalves CA. Decreased peripheral brain-derived neurotrophic factor levels are a biomarker of disease activity in major psychiatric disorders: a comparative meta-analysis. *Mol Psychiatry*. 2014 Jul;19(7):750-1.

Ferreira-Vieira, T. H., Guimaraes, I. M., Silva, F. R. & Ribeiro, F. M. Alzheimer's disease: targeting the cholinergic system. *Curr. Neuropharmacol*. 14, 101–115 (2016).

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 Nov;12(3):189-98.

Fratiglioni L, Launer LJ, Andersen K, Breteler MM, Copeland JR, Dartigues JF, Lobo A, Martinez-Lage J, Soininen H, Hofman A. Incidence of dementia and major subtypes in Europe: A collaborative study of population-based cohorts. Neurologic Diseases in the Elderly Research Group. *Neurology.* 2000;54(11 Suppl 5):S10-5.

Friedman W. Growth Factors, in *Basic Neurochemistry*, 8th edition. Editors: Scott T. Brady, George J. Siegel, R. Wayne Albers, Donald L. Price. Academic Press. 2012;546-557.

Fujimura H, Altar CA, Chen R, Nakamura T, Nakahashi T, Kambayashi J, Sun B, Tandon NN. Brain-derived neurotrophic factor is stored in human platelets and released by agonist stimulation. *Thromb Haemost.* 2002 Apr;87(4):728-34.

Gao L, Zhang Y, Sterlin K, Song W. Brain-derived neurotrophic factor in Alzheimer's disease and its pharmaceutical potential. *Transl Neurodegener.* 2022 Jan 28;11(1):4.

Gejl AK, Enevold C, Bugge A, Andersen MS, Nielsen CH, Andersen LB. Associations between serum and plasma brain-derived neurotrophic factor and influence of storage time and centrifugation strategy. *Sci Rep.* 2019 Jul 4;9(1):9655.

Green MJ, Matheson SL, Shepherd A, Weickert CS, Carr VJ. Brain-derived neurotrophic factor levels in schizophrenia: a systematic review with meta-analysis. *Mol Psychiatry* 2011;16:960–972.

Hersch E. C., Falzgraf S. Management of the behavioral and psychological symptoms of dementia. *Clinical interventions in aging.* 2007;2:611-621.

Hippius H, Neundorfer G. The Discovery of Alzheimer's Disease. *Dialogues Clin Neurosci.* 2003 Mar; 5(1): 101–108.

Hofer M, Pagliusi SR, Hohn A, Leibrock J, Barde YA. Regional distribution of brain derived neurotrophic factor mRNA in the adult mouse brain. *EMBO J.* 1990;9(8):2459–64.

Hsiao YH, Hung HC, Chen SH, Gean PW. Social interaction rescues memory deficit in an animal model of Alzheimer's disease by increasing BDNF-dependent hippocampal neurogenesis. *J Neurosci*. 2014;34(49):16207–19.

Huang EJ, Reichardt LF. Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci* 2001;24:677–736.

Jerónimo-Santos A, Vaz SH, Parreira S, Rapaz-Lérias S, Caetano AP, Buée-Scherrer V, Castrén E, Valente CA, Blum D, Sebastião AM, Diógenes MJ. Dysregulation of TrkB Receptors and BDNF Function by Amyloid- $\beta$  Peptide is Mediated by Calpain. *Cereb Cortex*. 2015 Sep;25(9):3107-21.

Kim BY, Lee SH, Grama PL, Angelucci F, Lucia A, Pareja-Galeano H, Leyhe T, Turana Y, Lee IR, Yoon JH, Shin JI. Peripheral Brain-Derived Neurotrophic Factor Levels in Alzheimer's Disease and Mild Cognitive Impairment: a Comprehensive Systematic Review and Meta-analysis. *Mol Neurobiol*. 2017 Nov;54(9):7297-7311.

Kunugi H, Ueki A, Otsuka M, Isse K, Hirasawa H, Kato N et al. A novel polymorphism of the brain derived neurotrophic factor (BDNF) gene associated with late-onset Alzheimer's disease. *Mol Psychiatry* 2001; 6: 83–86.

L. Chouliaras, B.P.F. Rutten, G. Kenis, O. Peerbooms, P.J. Visser, F. Verhey, et al., Epigenetic regulation in the pathophysiology of Alzheimer's disease, *Prog. Neurobiol*. 90 (2010) 498–510.

Laske C, Stellos K, Hoffmann N, Stransky E, Straten G, Eschweiler GW, Leyhe T. Higher BDNF serum levels predict slower cognitive decline in Alzheimer's disease patients. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2011 Apr;14(3):399-404.

Laske C, Stransky E, Leyhe T, Eschweiler GW, Wittorf A, Richartz E, Bartels M, Buchkremer G, Schott K. Stage-dependent BDNF serum concentrations in Alzheimer's disease. *J Neural Transm (Vienna)*. 2006 Sep;113(9):1217-24.

Lewin GR, Carter BD. *Neurotrophic Factors*. Springer. 2014.

Lim YY, Hassenstab J, Cruchaga C, Goate A, Fagan AM, Benzinger TL, et al. BDNF Val66Met moderates memory impairment, hippocampal function and tau in preclinical autosomal dominant Alzheimer's disease. *Brain*. 2016;139(Pt 10):2766–77.

Lim YY, Villemagne VL, Laws SM, Ames D, Pietrzak RH, Ellis KA, et al. BDNF Val66Met, Abeta amyloid, and cognitive decline in preclinical Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2013;34(11):2457–64.

Liu PP, Meng XY, Kang JS. History and progress of hypotheses and clinical trials for Alzheimer's disease. *Signal Transduction and Targeted Therapy* (2019) 4:29.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>(Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001 Dec;25(4):402-8.

Livingston G, Huntley J, Sommerlad A, Ames D, Ballard C, Banerjee S, Brayne C, Burns A, Cohen-Mansfield J, Cooper C, et al. Dementia prevention, intervention, and care: 2020 report of the Lancet Commission. *Lancet*. 2020;396:413–446.

Lommatzsch M, Zingler D, Schuhbaeck K, Schloetcke K, Zingler C, Schuff-Werner P, Virchow JC. The impact of age, weight and gender on BDNF levels in human platelets and plasma. *Neurobiol Aging*. 2005 Jan;26(1):115-23.

Malnar M, Košiček M, Hećimović S. Alzheimerova bolest: od molekularnog mehanizma do rane dijagnoze. *Medicina*. 2009;45:234-243.

Mankhong S, Kim S, Lee S, Kwak HB, Park DH, Joa KL, Kang JH. Development of Alzheimer's Disease Biomarkers: From CSF- to Blood-Based Biomarkers. *Biomedicines* 2022, 10, 850.

Mañucat-Tan NB, Saadipour K, Wang Y-J, Bobrovskaya L, Zhou XF. Cellular trafficking of amyloid precursor protein in Amyloidogenesis physiological and pathological significance. *Mol Neurobiol*. 2019;56(2):812–30.

Marcos G, Santabárbara J, Lopez-Anton R, De-la-Cámara C, Gracia-García P, Lobo E, Pérez G, Menchón JM, Palomo T, Stephan BC, Brayne C, Lobo A; ZARADEMP Workgroup. Conversion to dementia in mild cognitive impairment diagnosed with DSM-5 criteria and with Petersen's criteria. *Acta Psychiatr Scand*. 2016 May;133(5):378-85.

Matrone C, Ciotti MT, Mercanti D, Marolda R, Calissano P. NGF and BDNF signaling control amyloidogenic route and Abeta production in hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Sep 2;105(35):13139-44.

Maynard KR, Hill JL, Calcaterra NE, Palko ME, Kardian A, Paredes D, et al. Functional role of BDNF production from unique promoters in aggression and serotonin signaling. *Neuropsychopharmacology*. 2015;41:1943.

Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*. 1988 Feb 11; 16(3): 1215.

Mimica N, Kušan Jukić M, Presečki P, Ivičić M, Braš M, Vrbić Lj, Boban M, Pivac N, Brinar P, Vuksan Ćusa B, Borovečki F, Tomasović Mrčela N, Vitezić D, Fingler M, Šimić G, Vučevac V, Đorđević V, Bilić P, Klepac N, Jukić V, Galić S, Budigram B, Filipičić I, Vidović D, Glamuzina K. Hrvatska strategija borbe protiv Alzheimerove bolesti i drugih demencija – prijedlog nacrtu uz nadopune. Nadopunjena i ažurirana verzija teksta objavljenog u *Neurologia Croatica* 2014;63(Suppl. 2):159-167. *Medix* 2015;117:111-118.

Mimica N, Presečki P. Alzheimerova bolest – epidemiologija, dijagnosticiranje i standardno farmakološko liječenje. *Medix*. 2012;101/102:153-158.

Minichiello L. TrkB signalling pathways in LTP and learning. *Nat Rev Neurosci* 2009;10, 850–860.

Moreno I, Stojanovic-Pérez A, Bulduk B, Sánchez-Gistau V, Algora MJ, Ortega L, Muntané G, Vilella E, Labad J, Martorell L. High blood levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) mRNA in early psychosis are associated with inflammatory markers. *J Psychiatr Res*. 2023 Aug;164:440-446.

Nagahara AH, Merrill DA, Coppola G, Tsukada S, Schroeder BE, Shaked GM, et al. Neuroprotective effects of brain-derived neurotrophic factor in rodent and primate models of Alzheimer's disease. *Nat Med.* 2009;15(3):331–7.

Nakahashi T, Fujimura H, Altar CA, Li J, Kambayashi J, Tandon NN, et al. Vascular endothelial cells synthesize and secrete brain-derived neurotrophic factor. *FEBS Letters.* 2000;470:113–117.

Nigam SM, Xu S, Kritikou JS, Marosi K, Brodin L, Mattson MP. Exercise and BDNF reduce A $\beta$  production by enhancing  $\alpha$ -secretase processing of APP. *J Neurochem.* 2017;142(2):286–96.

Nikolac N, Šupak Smolčić V, Šimundić AM, Čelap I. Hrvatsko društvo za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu: Nacionalne preporuke za uzorkovanje venske krvi. 01-2014/v.1-Zagreb, ožujak 2014.

Nikolac Perkovic M, Borovecki F, Filipic I, Vuic B, Milos T, Nedic Erjavec G, Konjevod M, Tudor L, Mimica N, Uzun S, Kozumplik O, Svob Strac D, Pivac N. Relationship between Brain-Derived Neurotrophic Factor and Cognitive Decline in Patients with Mild Cognitive Impairment and Dementia. *Biomolecules.* 2023 Mar 21;13(3):570.

Nishimura AL, Oliveira JR, Mitne-Neto M, Guindalini C, Nitrini R, Bahia VS, de Brito-Marques PR, Otto PA, Zatz M. Lack of association between the brain-derived neurotrophin factor (C-270T) polymorphism and late-onset Alzheimer's disease (LOAD) in Brazilian patients. *J Mol Neurosci.* 2004;22(3):257-60.

Olin D, MacMurray J, Comings DE. Risk of late-onset Alzheimer's disease associated with BDNF C270T polymorphism. *Neurosci Lett.* 2005 Jun 24;381(3):275-8.

Pan W, Banks WA, Fasold MB, Bluth J, Kastin AJ. Transport of brain-derived neurotrophic factor across the blood-brain barrier. *Neuropharmacology.* 1998 Dec;37(12):1553-61.



Peng S, Wu J, Mufson EJ, Fahnstock M. Precursor form of brain-derived neurotrophic factor and mature brain-derived neurotrophic factor are decreased in the pre-clinical stages of Alzheimer's disease. *J Neurochem.* 2005 Jun;93(6):1412-21.

Penke B, Szucs M, Bogar F. New Pathways Identify Novel Drug Targets for the Prevention and Treatment of Alzheimer's Disease. *Int. J. Mol. Sci.* 2023, 24, 5383.

Perez-Grijalba V, Romero J, Pesini P, Sarasa L, Monleon I, San-Jose I, Arbizu J, Martinez-Lage P, Munera J, Ruiz A, Tarraga M, Boada M, Sarasa M, The AB255 Study Group. Plasma A $\beta$ 42/40 Ratio Detects Early Stages of Alzheimer's Disease and Correlates with CSF and Neuroimaging Biomarkers in the AB255 Study. *The Journal of Prevention of Alzheimer's Disease.* 2019;6:34–41.

Pernecky R, Wagenpfeil S, Komossa K, Grimmer T, Diehl J, Kurz A. Mapping scores onto stages: mini-mental state examination and clinical dementia rating. *Am J Geriatr Psychiatry.* 2006 Feb;14(2):139-44.

Pivac N, Kim B, Nedić G, Joo YH, Kozarić-Kovacić D, Hong JP, Muck-Seler D. Ethnic differences in brain-derived neurotrophic factor Val66Met polymorphism in Croatian and Korean healthy participants. *Croat Med J.* 2009 Feb;50(1):43-8.

Pivac N, Nikolac M, Nedic G, Mustapic M, Borovecki F, Hajnsek S, Presecki P, Pavlovic M, Mimica N, Muck Seler D. Brain derived neurotrophic factor Val66Met polymorphism and psychotic symptoms in Alzheimer's disease. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 35 (2011) 356–362.

Pivac N, Nikolac M, Nedic G, Mustapic M, Borovecki F, Hajnsek S, Presecki P, Pavlovic M, Mimica N, Muck Seler D. Brain derived neurotrophic factor Val66Met polymorphism and psychotic symptoms in Alzheimer's disease. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2011 Mar 30;35(2):356-62.

Poduslo JF, Curran GL. Permeability at the blood-brain and blood-nerve barriers of the neurotrophic factors: NGF, CNTF, NT-3. *BDNF Mol Brain Res.* 1996;36(2):280–6.

Pruunsild P., Kazantseva A., Aid T., Palm K., Timmusk T. Dissecting the human BDNF locus: bidirectional transcription, complex splicing, and multiple promoters. *Genomics*. 2007;90:397-406.

Qin XY, Cao C, Cawley NX, Liu TT, Yuan J, Loh YP, Cheng Y. Decreased peripheral brain-derived neurotrophic factor levels in Alzheimer's disease: a meta-analysis study (N=7277). *Mol Psychiatry*. 2017 Feb;22(2):312-320.

Radka SF, Holst PA, Fritsche M, Altar CA. Presence of brain-derived neurotrophic factor in brain and human and rat but not mouse serum detected by a sensitive and specific immunoassay. *Brain Res* 1996;709(1):122–301.

Rafii MS, Tuszyński MH, Thomas RG, Barba D, Brewer JB, Rissman RA, Siffert J, Aisen PS, the AAV2-NGF Study Team. Adeno-Associated Viral Vector (Serotype 2)–Nerve Growth Factor for Patients With Alzheimer Disease. *JAMA Neurol*. 2018 Jul; 75(7): 834–841.

Ray S, Britschgi M, Herbert C, Takeda-Uchimura Y, Boxer A, Blennow K et al. Classification and prediction of clinical Alzheimer's diagnosis based on plasma signaling proteins. *Nat Med* 2007; 13: 1359–1362.

Riemenschneider M, Schwarz S, Wagenpfeil S, Diehl J, Müller U, Förstl H, Kurz A. A polymorphism of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is associated with Alzheimer's disease in patients lacking the Apolipoprotein E epsilon4 allele. *Mol Psychiatry*. 2002;7(7):782-5.

Russo-Neustadt A. Brain-derived neurotrophic factor, behavior, and new directions for the treatment of mental disorders. *Semin Clin Neuropsychiatry* 2003;8: 109–18.

Sachs-Ericsson N, Blazer DG. The new DSM-5 diagnosis of mild neurocognitive disorder and its relation to research in mild cognitive impairment. *Aging Ment Health* 2015;19:2-12.

Samton JB, Ferrando SJ, Sanelli P, Karimi S, Raiteri V, Barnhill JW. The clock drawing test: diagnostic, functional, and neuroimaging correlates in older medically ill adults. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*. 2005 Fall;17(4):533-40.

Savaskan E, Müller-Spahn F, Olivieri G, Bruttel S, Otten U, Rosenberg C, Hulette C, Hock C. Alterations in trk A, trk B and trk C receptor immunoreactivities in parietal cortex and cerebellum in Alzheimer's disease. *Eur Neurol.* 2000;44(3):172-80.

Scharfman HE, MacLusky NJ. Estrogen and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in hippocampus: complexity of steroid hormone-growth factor interactions in the adult CNS. *Front Neuroendocrinol.* 2006 Dec;27(4):415-35.

Scheffer S, Hermkens DMA, van der Weerd L, de Vries HE, Daemen MJAP. Vascular hypothesis of Alzheimer disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2021;41:1265–1283.

Serretti A, Olgiati P, De Ronchi D. Genetics of Alzheimer's disease. A rapidly evolving field. *J Alzheimers Dis* 2007;12:73–92.

Shimada H, Makizako H, Doi T, Yoshida D, Tsutsumimoto K, Anan Y, Uemura K, Lee S, Park H, Suzuki T. A large, cross-sectional observational study of serum BDNF, cognitive function, and mild cognitive impairment in the elderly. *Front Aging Neurosci.* 2014 Apr 15;6:69.

Sošić M, Vuletić V, Tomić Z, Bodganović N. Dijagnostički i terapijski pristup pacijentu s kognitivnim smetnjama. *medicina fluminensis* 2018;54(2):140-154.

Sperling RA, Aisen PS, Beckett LA, Bennett DA, Craft S, Fagan AM, Iwatsubo T, Jack CR Jr, Kaye J, Montine TJ, Park DC, Reiman EM, Rowe CC, Siemers E, Stern Y, Yaffe K, Carrillo MC, Thies B, Morrison-Bogorad M, Wagster MV, Phelps CH. Toward defining the preclinical stages of Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement.* 2011 May;7(3):280-92.

Sunderland T, Hill JL, Mellow AM, Lawlor BA, Gundersheimer J, Newhouse PA, Grafman JH. Clock drawing in Alzheimer's disease. A novel measure of dementia severity. *J Am Geriatr Soc.* 1989 Aug;37(8):725-9.

Tan CC, Yu JT, Tan L. Biomarkers for Preclinical Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease* 42 (2014) 1051–1069.

Tao X, West AE, Chen WG, Corfas G, Greenberg ME. A calcium-responsive transcription factor, *carf*, that regulates neuronal activity-dependent expression of BDNF. *Neuron*. 2002;33(3):383–95.

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 Mar-Apr;19(2):109-16.

UC San Diego Health, (2021). [Internet], <raspoloživo na: <https://health.ucsd.edu/news/press-releases/2021-02-18-first-in-human-clinical-trial-to-assess-gene-therapy-for-alzheimers-disease/>>, [05.09.2023.].

Vulturar R, Chiş A, Hambrich M, Kelemen B, Ungureanu L, Miu AC. Allelic distribution of BDNF Val66Met polymorphism in healthy Romanian volunteers. *Transl Neurosci*. 2016 Apr 22;7(1):31-34.

Wang C, Cui Y, Yang J, Zhang J, Yuan D, Wei Y et al. Combining serum and urine biomarkers in the early diagnosis of mild cognitive impairment that evolves into Alzheimer's disease in patients with the apolipoprotein E 4 genotype. *Biomarkers* 2015; 20: 84–88.

Wang ZH, Xiang J, Liu X, Ping Yu S, Manfredsson FP, Sandoval IM, Wu S, Wang JZ, Ye K. Deficiency in BDNF/TrkB Neurotrophic Activity Stimulates  $\delta$ -Secretase by Upregulating C/EBP $\beta$  in Alzheimer's Disease. *Cell Rep*. 2019 Jul 16;28(3):655-669.

Weickert CS, Hyde TM, Lipska BK, Herman MM, Weinberger DR, Kleinman JE . Reduced brain-derived neurotrophic factor in prefrontal cortex of patients with schizophrenia. *Mol Psychiatry* 2003;8:592–610.

Wessels JM, Agarwal RK, Somani A, Verschoor CP, Agarwal SK, Foster WG. Factors affecting stability of plasma brain-derived neurotrophic factor. *Sci Rep*. 2020 Nov 19;10(1):20232.

Wong J, Higgins M, Halliday G, Garner B. Amyloid beta selectively modulates neuronal TrkB alternative transcript expression with implications for Alzheimer's disease. *Neuroscience*. 2012 May 17;210:363-74.

World Health Organization (WHO). Global status report on the public health response to dementia. Geneva, 2021. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

Xia DY, Huang X, Bi CF, Mao LL, Peng LJ, Qian HR. PGC-1alpha or FNDC5 is involved in modulating the effects of Abeta1-42 oligomers on suppressing the expression of BDNF, a beneficial factor for inhibiting neuronal apoptosis, abeta deposition and cognitive decline of APP/PS1 Tg mice. *Front Aging Neurosci*. 2017;9:65.

Xie B, Liu Z, Liu W, Jiang L, Zhang R, Cui D, Zhang Q, Xu S. DNA Methylation and Tag SNPs of the BDNF Gene in Conversion of Amnestic Mild Cognitive Impairment into Alzheimer's Disease: A Cross-Sectional Cohort Study. *J Alzheimers Dis*. 2017;58(1):263-274.

Xu L, Tian D, Li J, Chen L, Tang L, Fan D. The Analysis of Two BDNF Polymorphisms G196A/C270T in Chinese Sporadic Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Front Aging Neurosci*. 2017 May 10;9:135.

Yaari R, Corey-Bloom J. Alzheimer's disease. *Semin Neurol*. 2007;27(1):32-41.

Yoshida T, Ishikawa M, Niitsu T, Nakazato M, Watanabe H, Shiraishi T, Shiina A, Hashimoto T, Kanahara N, Hasegawa T, Enohara M, Kimura A, Iyo M, Hashimoto K. Decreased serum levels of mature brain-derived neurotrophic factor (BDNF), but not its precursor proBDNF, in patients with major depressive disorder. *PLoS One*. 2012;7(8):e42676.

Zagrebelsky M, Holz A, Dechant G, Barde YA, Bonhoeffer T, Korte M. The p75 Neurotrophin Receptor Negatively Modulates Dendrite Complexity and Spine Density in Hippocampal Neurons. *J Neurosci*. 2005 Oct 26; 25(43): 9989–9999.

## 9. SAŽETAK/SUMMARY

### 9.1. SAŽETAK

Alzheimerova bolest (AB) je progresivni neurodegenerativni poremećaj, a neurobiološke promjene karakteristične za AB nastupaju vrlo rano u odnosu na vrijeme ispoljavanja kliničkih simptoma. Blagi kognitivni poremećaj (engl. *mild cognitive impairment*, MCI), u nekim slučajevima, može prethoditi AB-u. Ranije postavljanje dijagnoze, prije nastanka značajnih kognitivnih deficita, te pravovremena terapijska intervencija, uvelike bi promijenili kvalitetu života i ishode oboljelih. U tu se svrhu intenzivno istražuju novi biljezi i terapijske mete, poput moždanog neurotrofnog čimbenika (engl. *brain-derived neurotrophic factor*, BDNF).

Cilj ovog istraživanja bio je ispitati može li se razina ekspresije BDNF-a (na razini gena i proteina) povezati sa stupnjem kognitivnog deficita, te istražiti povezanost dva najčešće istraživana polimorfizma gena *BDNF* s dijagnozom AB-a, razinom kognitivnog oštećenja i utvrditi postoji li utjecaj navedenih polimorfizama na ekspresiju gena *BDNF* ili na koncentraciju ovog neurotrofina na periferiji. U istraživanje je bilo uključeno 153 ispitanika, podijeljenih prema dijagozi na ispitanike s AB-om i one s dijagnozom MCI-ja. Za analizu su korišteni uzoci pune krvi iz koje je izvojena plazma siromašna trombocitima za određivanje koncentracije BDNF-a, a frakcija s leukocitima korištena je za izolaciju ukupne RNA i DNA, odnosno određivanje ekspresije gena *BDNF* i genotipizaciju polimorfizama gena *BDNF* rs6265 i rs56164415.

Rezultati istraživanja upućuju na višu koncentraciju BDNF-a u plazmi ispitanika oboljelih od AB-a u odnosu na ispitanike s MCI-jem, uz negativnu korelaciju između koncentracije BDNF-a u plazmi i ostvarenog broja bodova na psihometrijskim testovima. Osim toga, zabilježena je niža relativna ekspresija gena *BDNF* u ispitanika oboljelih od AB-a u odnosu na ispitanike s MCI-jem, što upućuje na moguće kompenzatorne neuroprotektivne mehanizme. Promatranjem polimorfizama gena *BDNF*, zabilježena je viša učestalost alela A, s obzirom na polimorfizam rs6265, u skupini ispitanika oboljelih od AB-a. Značajno bolje očuvane kognitivne funkcije zabilježene su kod homozigota GG s obzirom na polimorfizam rs6265, odnosno kod nositelja alela T u slučaju polimorfizma rs56164415, što upućuje na postojanje rizičnih alela za navedene polimorfizme i time daje uvid u nasljednu komponentu bolesti. Dostupni podaci u literaturi su heterogeni i potrebna su daljnja istraživanja, s naglaskom na uključivanje kontrolne skupine zdravih ispitanika usklađenih po dobi.

## 9.2. SUMMARY

Alzheimer's disease (AD) is a progressive neurodegenerative disorder, with characteristic neurobiological changes appearing decades prior to symptom onset. In some cases, mild cognitive impairment (MCI) precedes AD. Earlier diagnosis, before significant cognitive decline, would allow for earlier intervention and better quality of life for those affected. Therefore, significant scientific effort is directed at the discovery of new biomarkers and therapeutic targets for AD, such as brain-derived neurotrophic factor (BDNF).

The aim of this study was to analyze whether there is a connection between BDNF expression and cognitive decline, and whether the two most investigated *BDNF* polymorphisms affect AD diagnosis, cognitive decline, *BDNF* expression or plasma BDNF concentration. A total of 153 participants were included in the study, divided into two subgroups according to diagnosis (AB or MCI). Whole blood samples were processed in order to obtain platelet-poor plasma, which was used for the determination of BDNF concentration. Genomic DNA and total RNA were isolated from peripheral blood for determining relative *BDNF* expression and genotyping of *BDNF* polymorphisms rs6265 and rs56164415.

Results suggest significantly increased plasma BDNF concentration in AD patients compared to MCI subjects, while negative correlation was observed between plasma BDNF concentration and psychometric test scores. Furthermore, lower *BDNF* gene expression was noticed in patients with AD compared to MCI subjects. These findings might suggest compensatory neuroprotective mechanisms. Regarding *BDNF* polymorphisms, a higher frequency of A allele (rs6265) was detected in AD patients, while rs6265 GG homozygotes and/or carriers of rs56164415 T allele performed better on psychometric tests. Identifying A and C alleles as risk alleles gives us a better insight into genetic factors possibly affecting disease progression. Current published data are heterogenous and further studies are needed, with an emphasis on inclusion of healthy age-matched controls.

## Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet  
Studij: Medicinska biokemija  
Zavod za medicinsku biokemiju i hematologiju  
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

### EKSPRESIJA MOŽDANOG NEUROTROFNOG ČIMBENIKA U ALZHEIMEROVOJ BOLESTI

Kristina Bišof

#### SAŽETAK

Alzheimerova bolest (AB) je progresivni neurodegenerativni poremećaj, a neurobiološke promjene karakteristične za AB nastupaju vrlo rano u odnosu na vrijeme ispoljavanja kliničkih simptoma. Blagi kognitivni poremećaj (engl. *mild cognitive impairment*, MCI), u nekim slučajevima, može prethoditi AB-u. Ranije postavljanje dijagnoze, prije nastanka značajnih kognitivnih deficita, te pravovremena terapijska intervencija, uvelike bi promijenili kvalitetu života i ishode oboljelih. U tu se svrhu intenzivno istražuju novi biljezi i terapijske mete, poput moždanog neurotrofnog čimbenika (engl. *brain-derived neurotrophic factor*, BDNF). Cilj ovog istraživanja bio je ispitati može li se razina ekspresije BDNF-a (na razini gena i proteina) povezati sa stupnjem kognitivnog deficita, te istražiti povezanost dva najčešće istraživana polimorfizma gena BDNF s dijagnozom AB-a, razinom kognitivnog oštećenja i utvrditi postoji li utjecaj navedenih polimorfizama na ekspresiju gena BDNF ili na koncentraciju ovog neurotrofina na periferiji. U istraživanje je bilo uključeno 153 ispitanika, podijeljenih prema dijagozi na ispitanike s AB-om i one s dijagnozom MCI-ja. Za analizu su korišteni uzoci pune krvi iz koje je izvojena plazma siromašna trombocitima za određivanje koncentracije BDNF-a, a frakcija s leukocitima korištena je za izolaciju ukupne RNA i DNA, odnosno određivanje ekspresije gena BDNF i genotipizaciju polimorfizama gena BDNF rs6265 i rs56164415. Rezultati istraživanja upućuju na višu koncentraciju BDNF-a u plazmi ispitanika oboljelih od AB-a u odnosu na ispitanike s MCI-jem, uz negativnu korelaciju između koncentracije BDNF-a u plazmi i ostvarenog broja bodova na psihometrijskim testovima. Osim toga, zabilježena je niža relativna ekspresija gena BDNF u ispitanika oboljelih od AB-a u odnosu na ispitanike s MCI-jem, što upućuje na moguće kompenzatorne neuroprotektivne mehanizme. Promatranjem polimorfizama gena BDNF, zabilježena je viša učestalost alela A, s obzirom na polimorfizam rs6265, u skupini ispitanika oboljelih od AB-a. Značajno bolje očuvane kognitivne funkcije zabilježene su kod homozigota GG s obzirom na polimorfizam rs6265, odnosno kod nositelja alela T u slučaju polimorfizma rs56164415, što upućuje na postojanje rizičnih alela za navedene polimorfizme i time daje uvid u nasljednu komponentu bolesti. Dostupni podaci u literaturi su heterogeni i potrebna su daljnja istraživanja, s naglaskom na uključivanje kontrolne skupine zdravih ispitanika usklađenih po dobi.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 82 stranice, 11 grafičkih prikaza, 19 tablica i 111 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Gljučne riječi: moždani neurotrofni čimbenik, Alzheimerova bolest, blagi kognitivni poremećaj

Mentor: **glavna mentorica prof. dr. sc. Karmela Barišić**, redovita profesorica u trajnom zvanju Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta, **komentorica doc. dr. sc. Matea Nikolac Perković**, znanstvena suradnica Instituta Ruđer Bošković

Ocjenjivači: **prof. dr. sc. Karmela Barišić**, redovita profesorica u trajnom zvanju Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.  
**prof. dr. sc. Lidija Bach-Rojecky**, redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.  
**doc. dr. sc. Matea Nikolac Perković**, znanstvena suradnica Instituta Ruđer Bošković.

Rad prihvaćen: studeni 2023.



## Basic documentation card

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Study: Medical Biochemistry  
Department of Medical Biochemistry and Hematology  
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

### EXPRESSION OF BRAIN-DERIVED NEUROTROPHIC FACTOR IN ALZHEIMER'S DISEASE

**Kristina Bišof**

#### SUMMARY

Alzheimer's disease (AD) is a progressive neurodegenerative disorder, with characteristic neurobiological changes appearing decades prior to symptom onset. In some cases, mild cognitive impairment (MCI) precedes AD. Earlier diagnosis, before significant cognitive decline, would allow for earlier intervention and better quality of life for those affected. Therefore, significant scientific effort is directed at the discovery of new biomarkers and therapeutic targets for AD, such as brain-derived neurotrophic factor (BDNF). The aim of this study was to analyze whether there is a connection between BDNF expression and cognitive decline, and whether the two most investigated BDNF polymorphisms affect AD diagnosis, cognitive decline, BDNF expression or plasma BDNF concentration. A total of 153 participants were included in the study, divided into two subgroups according to diagnosis (AB or MCI). Whole blood samples were processed in order to obtain platelet-poor plasma, which was used for the determination of BDNF concentration. Genomic DNA and total RNA were isolated from peripheral blood for determining relative BDNF expression and genotyping of BDNF polymorphisms rs6265 and rs56164415. Results suggest significantly increased plasma BDNF concentration in AD patients compared to MCI subjects, while negative correlation was observed between plasma BDNF concentration and psychometric test scores. Furthermore, lower BDNF gene expression was noticed in patients with AD compared to MCI subjects. These findings might suggest compensatory neuroprotective mechanisms. Regarding BDNF polymorphisms, a higher frequency of A allele (rs6265) was detected in AD patients, while rs6265 GG homozygotes and/or carriers of rs56164415 T allele performed better on psychometric tests. Identifying A and C alleles as risk alleles gives us a better insight into genetic factors possibly affecting disease progression. Current published data are heterogenous and further studies are needed, with an emphasis on inclusion of healthy age-matched controls.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 82 pages, 11 figures, 19 tables and 111 references. Original is in Croatian language.

Keywords: brain-derived neurotrophic factor, Alzheimer's disease, mild cognitive impairment

Mentor: **Primary mentor prof. Karmela Barišić, PhD., Tenured Professor**, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry, **co-mentor asst. prof. Matea Nikolac Perković, PhD, Research Associate**, Ruđer Bošković Institute

Reviewers: **prof. Karmela Barišić, PhD, Tenured Professor**, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**prof. Lidija Bach-Rojecky, PhD, Full Professor**, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**asst. prof. Matea Nikolac Perković, PhD, Research Associate**, Ruđer Bošković Institute

The thesis was accepted: November 2023.