

Određivanje graničnih vrijednosti biljega Alzheimerove demencije u likvoru

Džimbeg, Monika

Master's thesis / Diplomski rad

2024

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:163:621174>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-09**



Repository / Repozitorij:

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



Monika Džimbeg

Određivanje graničnih vrijednosti biljega

Alzheimerove demencije u likvoru

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2024.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na kolegiju Neurokemija Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Zagreb pod stručnim vodstvom doc.dr.sc. Željke Vogrinc

Srdačno zahvaljujem svojoj mentorici doc. dr. sc. Željki Vogrinc na stručnom vodstvu te velikoj pomoći pri izradi ovoga diplomskog rada.

Sadržaj

1. UVOD.....	1
1.1. O demencijama.....	1
1.1.1. Alzheimerova demencija.....	2
1.1.2. Miješana demencija.....	3
1.1.3. Dijagnostika demencija.....	3
1.1.4. Liječenje.....	4
1.2. Tau i pTau proteini.....	5
1.3. Beta-amiloid (A β).....	6
1.4. Cerebrospinalna tekućina (likvor).....	7
1.6. Metode za određivanje biljega demencije u CSF.....	8
1.6.1 ELISA metoda određivanja biljega u likvoru.....	8
1.7. Cutoff ili granična vrijednost.....	9
2. OBRAZLOŽENJE TEME.....	11
3. MATERIJALI I METODE.....	12
3.1. Uzorci i uzorkovanje.....	12
3.2. Reagensi i potrebna oprema.....	12
3.3. Postupak.....	13
3.3.1. Načelo postupka.....	13
3.3.2. Predanalitička faza.....	13
3.3.3. Analitička faza za određivanje Tau proteina.....	14
3.3.4. Analitička faza za određivanje pTau proteina.....	14
3.3.5. Analitička faza za određivanje beta amiloida.....	15
3.4. Postanalitičke metode.....	15
3.4.1. Izračun rezultata.....	15
3.4.2. Statistički testovi.....	16
4. REZULTATI.....	17
4.1. ROC krivulje.....	17

4.1.1. Analiza ROC krivulje za Tau protein.....	18
4.1.2. Analiza ROC krivulje za pTau protein.....	18
4.1.3. Analiza ROC krivulje za beta-amiloid(1-42).....	19
4.1.4. Usporedba ROC krivulja.....	20
4.2. Statistička analiza dijagnostičke osjetljivosti i specifičnosti Tau proteina za određivanje Alzheimerove demencije.....	20
4.3. Statistička analiza dijagnostičke osjetljivosti i specifičnosti pTau proteina za određivanje Alzheimerove demencije.....	23
4.4. Statistička analiza dijagnostičke osjetljivosti i specifičnosti beta-amiloida (1-42) za određivanje Alzheimerove demencije.....	26
5. RASPRAVA.....	29
6. ZAKLJUČAK.....	31
7. POPIS KRATICA.....	32
8. LITERATURA.....	34
9. SAŽETAK.....	39

1.UVOD

1.1. O demencijama

Demencija je opći medicinski termin koji se koristi za opisivanje stanja u kojem dolazi do progresivnog gubitka kognitivnih funkcija, uključujući pamćenje, mišljenje, orijentaciju, rasuđivanje, pažnju i sposobnost obavljanja svakodnevnih aktivnosti. Demencija može biti uzrokovana različitim bolestima i poremećajima mozga te se često pojavljuje kod starijih osoba, iako može utjecati i na mlađe dobne skupine.

Broj osoba s demencijom diljem svijeta predviđa se da će porasti na 131,5 milijuna do 2050 (Renpei Sengoku, 2019).

Tipična i reprezentativna bolest koja se manifestira demencijom je Alzheimerova demencija (AD). Osim Alzheimerove demencije, nekoliko drugih bolesti poput demencije s Lewyjevim tijelima, vaskularne demencije i drugih manifestira se demencijom (Renpei Sengoku, 2019).

Demencije se mogu grubo podijeliti prema anatomskom položaju oštećenja u mozgu na kortikalne i subkortikalne, odnosno one koje zahvaćaju područje kore velikog mozga i one koje se nalaze ispod kore (Dukić, 2016).

Kortikalne demencije dovode do gubitka funkcija kao što je afazija (gubitak ili poremećaj govora), apraksija (nemogućnost izvođenja smislenih radnji) i agnozija (gubitak sposobnosti raspoznavanja). Uz to dolazi i do gubitka pamćenja odnosno amnezije i poremećaja u izvršnim funkcijama (planiranje, organiziranje, prosuđivanje). Primjer ove demencije je Alzheimerova demencija (Dukić, 2016).

Subkortikalne demencije rezultiraju usporavanjem mentalnih procesa i razmišljanja, smanjenom sposobnošću planiranja i procjene, te oštećenjem proceduralnog pamćenja. Karakteristično je da se subkortikalne demencije često pojavljuju kao dio kliničke slike drugih neuroloških oboljenja kao što su demencija u Huntingtonovoj i Parkinsonovoj bolesti, progresivna supranuklearna paraliza, multipla sustavna atrofija, Creutzfeldt-Jakobova bolest i multipla skleroza (Dukić, 2016).

Miješane demencije obuhvaćaju oštećenja u korteksu i subkortikalnim područjima mozga; to su demencije s Lewyjevim tjelešcima i kortikobazalna degeneracija. Sama podjela na kortikalne i

subkortikalne demencije moguća je u početnim stadijima bolesti, jer kako bolest napreduje, dolazi do različitih kombinacija kortikalnih i subkortikalnih simptoma (Dukić, 2016).

Treba također spomenuti i vaskularnu demenciju koja se javlja kao posljedica cerebrovaskularnih bolesti, odnosno nakon većeg ishemijskog ili hemoragijskog moždanog udara (Dukić, 2016).

1.1.1. Alzheimerova demencija

Alzheimerova demencija je kompleksno neurodegenerativno stanje koje se karakterizira progresivnim gubitkom kognitivnih funkcija koje uključuju pamćenje, mišljenje, orijentaciju, rasuđivanje, pažnju i sposobnost obavljanja svakodnevnih aktivnosti (Guendouzi and Savage, 2017).

Glavni fiziološki znakovi Alzheimerove demencije su nakupljanje beta-amiloidnih plakova izvan stanica mozga i formiranje neurofibrilarnih snopova unutar stanica mozga. Ovi patološki procesi uzrokuju progresivnu atrofiju mozga, posebno u područjima povezanim s memorijom i kognitivnim funkcijama (Renpei Sengoku, 2019).

Beta-amiloidni plakovi nastaju iz fragmentacije i abnormalnog skladištenja beta-amiloidnih proteina, dok se neurofibrilarni snopići formiraju zbog abnormalne fosforilacije Tau proteina, što dovodi do agregacije tih proteina u intracelularne strukture koje ometaju normalno funkcioniranje neurona (Renpei Sengoku, 2019).

Ovaj patološki proces rezultira gubitkom veza između neurona i propadanjem neuronskih mreža, što dovodi do progresivnog propadanja kognitivnih funkcija. Početni simptomi Alzheimerove demencije uključuju poteškoće s pamćenjem nedavnih događaja, poteškoće u planiranju i rješavanju problema te gubitak interesa za aktivnosti koje su nekada bile uobičajene. Kako bolest napreduje, simptomi postaju sve ozbiljniji, uključujući disfunkciju govora, poteškoće s kretanjem i potpunu ovisnost o njezi (Chouraki and Seshadri, 2014).

Iako točan uzrok Alzheimerove demencije još uvijek nije u potpunosti razjašnjen, smatra se da genetski faktori, okolišni čimbenici i procesi starenja imaju ključnu ulogu u njezinom razvoju. Istraživanja su također pokazala da upalni procesi u mozgu mogu doprinijeti progresiji bolesti (Chouraki and Seshadri, 2014).

Za sada ne postoji lijek koji može zaustaviti ili preokrenuti progresiju Alzheimerove demencije, iako se razvijaju terapije usmjerene na ublažavanje simptoma i usporavanje napredovanja bolesti. Međutim, istraživanja u području neurobiologije i genetike Alzheimerove demencije nastavljaju se kako bi se bolje razumjeli mehanizmi bolesti i razvile učinkovitije terapije (Chouraki and Seshadri, 2014).

1.1.2. Miješana demencija

Miješana demencija (MD) je oblik demencije koji kombinira karakteristike više različitih tipova demencije. Najčešće, miješana demencija odnosi se na kombinaciju Alzheimerove bolesti i vaskularne demencije, ali može uključivati i druge oblike demencije kao što su frontotemporalna demencija ili Lewyjevo tijelo demencija (K.A. Jellinger and J. Attems, 2007).

U miješanoj demenciji, osoba ima patološke promjene u mozgu koje su povezane s više različitih oblika demencije. Na primjer, osoba može imati nakupljanje beta-amiloidnih plakova i neurofibrilarnih snopića karakterističnih za Alzheimerovu bolest, kao i oštećenje krvnih žila u mozgu karakteristično za vaskularnu demenciju. Ovi patološki procesi zajedno doprinose progresiji gubitka kognitivnih funkcija i simptoma demencije (K.A. Jellinger and J. Attems, 2007).

1.1.3. Dijagnostika demencija

Za dijagnostiku demencija koriste se raznolike i napredne dijagnostičke tehnike za identifikaciju oštećenja mozga (poput CT-a, MR-a, fMR-a, PET-a i SPECT-a) te uzroka demencije. Međutim, ključni korak u dijagnostici ostaje uzimanje anamneze (često dobivena od obitelji pacijenta, zbog detaljnih opisa simptoma) i obavljanje detaljnog pregleda (psihijatrijskog, internističkog i neurološkog) (Hickey, 2011).

Stupanj bolesti ili kognitivnog oštećenja često se procjenjuje korištenjem jednostavnog i brzog testa poput Mini Mental State Examination (MMSE) (Feldman et al., 2008).

Laboratorijskim testovima krvi mogu se identificirati potencijalno reverzibilni uzroci demencije (uključujući krvnu sliku, elektrolite, glukozu, jetrene enzime, bubrežnu funkciju,

hormone štitnjače i nadbubrežne žlijezde, te serološke testove za sifilis, HIV i boreliju, kao i razine folata, homocisteina i vitamina B12) (Hickey, 2011).

Analizom cerebrospinalne tekućine mogu se otkriti upalni uzroci i biološki pokazatelji Alzheimerove bolesti. Biljezi koji se određuju u likvoru za diferenciranje demencija su Tau i pTau protein, te beta-amiloid(1-42).

Različite demencije imaju različite uzroke pa tako se i laboratorijsko dijagnosticiranje razlikuje. Laboratorijski nalaz cerebrospinalne tekućine najviše pomaže u dijagnosticiranju AD iako neke demencije kao vaskularna demencija isto pokazuju povišenja u razinama Tau proteina, no ne tako značajne promjene u sva tri biomarkera kao AD (Bruun et al., 2018).

1.1.4. Liječenje

Trenutno postoje dva pristupa u terapiji simptoma Alzheimerove bolesti. Inhibitori acetilkolinesteraze djeluju na povećanje koncentracije acetilkolina u korteksu, smanjene uslijed gubitka neurona u bazalnim jezgrama prednjeg mozga (nucleus basalis Meynert). Slični, ali suprotni učinci primjećuju se kod senzibilizatora nikotinskih acetilkolinskih receptora. Ovi lijekovi ciljaju na suzbijanje prekomjernog oslobađanja glutamata koje proizlazi iz gubitka kortikalnih neurona, poboljšavajući omjer signala i šuma u glutamatergičkoj transmisiji i potencijalno štiteći neurone od toksičnih učinaka kronično povećane izloženosti glutamatu (Pernecky, 2019).

Kliničke koristi ovih lijekova povezane su s odgodom napredovanja simptoma tijekom nekoliko mjeseci, no utjecaj na svakodnevnu funkciju i druge relevantne pokazatelje kao što su ponašajni i psihološki simptomi demencije nije dosljedan. Nadalje, učinkovitost je pokazana samo u fazi demencije Alzheimerove bolesti, a ne u ranim fazama bolesti. Još uvijek se razvijaju novi simptomatski lijekovi, te bi kombinacija lijekova koji mijenjaju tijek bolesti s terapijom usmjerenom na simptome mogla biti učinkovita u budućnosti, posebno kod osoba koje već pokazuju blage simptome Alzheimerove bolesti (Pernecky, 2019).

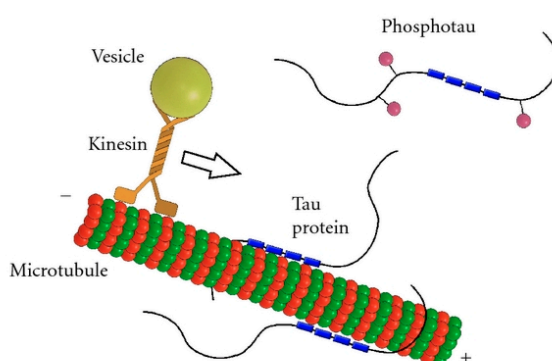
Suvremeni pristupi tretiranju AD okrenuli su se i sprječavanju nakupljanja A β te uklanjanju nakupina A β u obliku aktivne i pasivne imunoterapije. Dok je aktivna imunoterapija u obliku cjepiva je ukinuta u kliničkim ispitivanjima, pasivna je pokazala obećavajuće rezultate, posebice antitijelo u lijeku aducanumab. Aducanumab je humano IgG1 monoklonsko antitijelo koje se

veže za N-kraj A β u produženoj konformaciji. Antitijelo cilja A β agregate, uključujući topljive oligomere i netopljive fibrile (Song et al., 2022).

1.2. Tau i pTau proteini

Tau protein je strukturni protein koji se nalazi u neuronskim stanicama, posebno u aksonima, gdje igra ključnu ulogu u održavanju stabilnosti mikrotubula i regulaciji intracelularnog transporta. Glavna funkcija Tau proteina je povezana s održavanjem strukture i stabilnosti neuronskih procesa. Tau, osim što stabilizira mikrotubule i sudjeluje u njihovoj dinamici, igra ulogu u nekoliko fizioloških procesa, uključujući mielinaciju, aksonalni transport, neurogenezu, motoričku funkciju, učenje i pamćenje, neuronsku ekscitabilnost, metabolizam glukoze, homeostazu željeza i zaštitu DNA-e. Bolesti koje proizlaze iz promjena u količini ili sastavu Tau proteina se zovu tauopatijama (Roda et al., 2022) .

Tau je izražen u centralnom i perifernom živčanom sustavu. U mozgu, Tau je podložan posttranslacijskim modifikacijama, uključujući fosforilaciju, acetilaciju, metilaciju, glikaciju itd. Uloga svih ovih modifikacija u funkciji Tau proteina ostaje nepoznata. Najistraženija posttranslacijska modifikacija Tau proteina je fosforilacija, jer unatoč značajnoj heterogenosti koja postoji među različitim tauopatijama, deponirani Tau u patološkim lezijama uvijek je visoko fosforiliran. Fosforilacija Tau proteina negativno regulira njegovu sposobnost interakcije s mikrotubulima (Roda et al., 2022).



Slika 1. Tau protein i pTau protein i njihova strukturna funkcija [online](https://proteopedia.org/wiki/index.php/Tau_protein))(Pristupljeno 12. Ruj. 2024)

Iako se pokazalo da su svi agregirani Tau proteini fosforilirani, nije dokazano da je to znak za agregaciju pošto postoje fosforilirani Tau proteini (pTau) koji vrše normalno funkciju i nisu agregirani. Isto tako je predložena dvostruka hipoteza puta pretjerane fosforilacije Tau proteina. Jedan put je taj da nakupljanje beta-amiloida je ono što potiče fosforilaciju, dok je druga hipoteza da postoji okidač koji potakne i Tau fosforilaciju i nakupljanje beta-amiloida. Primjer jednog okidača je sami imunski sustav (Roda et al., 2022).

1.3. Beta-amiloid (A β)

Beta-amiloid je peptidni fragment koji nastaje fragmentacijom veće molekule poznate kao beta-amiloid prekursor protein (APP). Normalno, APP se nalazi u membranama stanica mozga i drugih tkiva te obavlja različite funkcije, uključujući ulogu u staničnoj signalizaciji i adheziji. Međutim, u kontekstu Alzheimerove bolesti, procesi fragmentacije APP-a nepravilno generiraju beta-amiloidne fragmente koji imaju tendenciju da se agregiraju i formiraju patološke nakupine poznate kao beta-amiloidni plakovi (Roda et al., 2022).

Primijećeno je postojanje tri različite vrste vanstaničnih agregata beta-amiloidnih peptida (A β), koji se razlikuju po svojoj strukturi i mjestu nakupljanja. U području sive tvari mozga, A β se može nakupiti u obliku difuznih naslaga, koje izgleda da imaju ograničen utjecaj na okolno tkivo, te u gustim aksonskim plakovima, okruženim distrofičnim aksonima i glialnim procesima. Treća vrsta A β naslaga nalazi se u krvnim žilama mozga. Dok je veza između gustih jezgara A β i neuronske patologije pokazatelj njihove uloge u progresiji Alzheimerove bolesti, posljedice nakupljanja vaskularnog A β -a još uvijek nisu u potpunosti istražene. Otkriveno je da se peptid A β 42 češće nalazi u plakovima tako da smanjena koncentracija A β 42 u likvoru je jedan od dijagnostičkih znakova AD. Još jedan oblik A β koji se nalazi u plakovima je A β 40, no on se ne nalazi u znatnim količinama kao A β 42 (Roher et al., 1993).

Izostanak uspjeha u dosadašnjim naporima za odobravanje terapije protiv A β , kao i slaba korelacija koja je pronađena između kognitivnog propadanja i pojave amiloidnih plakova, navodi znanstvenu zajednicu na pitanje je li nakupljanje A β zapravo okidač neurodegeneracije u Alzheimerovoj bolesti (Roda et al., 2022).

1.4. Cerebrospinalna tekućina (likvor)

Cerebrospinalna tekućina (CSF) je bistra, bezbojna tekućina koja se prvenstveno izlučuje kao ultrafiltrat krvi putem plexus choroideusa. Unutar živčanog sustava obavlja nekoliko ključnih zaštitnih funkcija, uključujući strukturne, hidrodinamičke, metaboličke i imunološke funkcije. Jedna od najvažnijih funkcija CSF-a je pružanje mehaničke zaštite mozgu tijekom brzih i naglih pokreta glave te blagih trauma, čime se sprječava oštećenje nastalo sudarom između mozga i lubanje (Hayrettin Tumani, Huss and Bachhuber, 2018).

Prostor cerebrospinalne tekućine (CSF) obuhvaća intracerebralne ventrikule, subarahnoidne prostore kralježnice i mozga te središnji kanal kralježnične moždine. CSF štiti središnji živčani sustav održavanjem metaboličke homeostaze, opskrbom hranjivim tvarima, djelovanjem kao limfni sustav i regulacijom intrakranijalnog tlaka (Hayrettin Tumani, Huss and Bachhuber, 2018).

CSF prostor odvojen je od vaskularnog sustava krvno-likvorskom barijerom, dok krvno-moždana barijera održava homeostazu mozga. Iako obje barijere imaju slične funkcije, razlikuju se po morfološkim i funkcionalnim svojstvima. Propusne su za male molekule, makromolekule i stanice, a transport se odvija pasivnom difuzijom i aktivnim transportom (Hayrettin Tumani, Huss and Bachhuber, 2018).

Iz uzorka likvora se mogu raditi pretrage iz mikrobiologije, hematologije, biokemije, imunologije i virologije kojima se može dokazati prisutnost upale, virusa, krvnih stanica i biljega za AD, multiplu sklerozu i neurodegeneracije, te različite druge bolesti SŽS (Doherty and Forbes, 2014).

1.5. Lumbalna punkcija

Lumbalna punkcija je postupak koji se koristi u svrhu dobivanja uzorka likvora za laboratorijske pretrage, no lumbalnom punkcijom se mogu i aplicirati različiti lijekovi direktno u središnji živčani sustav.

Za uzorkovanje CSF lumbalnom punkcijom važno je prvo tražiti suglasnost pacijenta. Sami postupak lumbalne punkcije je najčešće bezopasan, ali se treba upozoriti osobu koju se punktira na moguće rizike kao što su mogućnost glavobolje nakon lumbalne punkcije, koja se javlja u

32% slučajeva prema objavljenim podacima. Ostali mogući rizici su nemogućnosti dobivanja likvora, pojava lokaliziranih modrica, krvarenja te lokalne nelagode na mjestu uboda. Nuspojave kao što su iatrogeni meningitis i ozljeda korijena živca izuzetno su rijetke. Prilikom punkcije treba zapisati podatke o postupku kao npr. položaj punkcije, anestezija, broj uzoraka, izgled likvora i sl. (Doherty and Forbes, 2014).

Lumbalna punkcija obično se izvodi tako da pacijent leži na boku ili sjedi savijenih koljena, kako bi se omogućio pristup prostoru između kralježaka u donjem dijelu leđa. Nakon što se koža sterilizira lokalnim anestetikom, tanka igla se umetne između kralježaka u lumbalni prostor. Najvažnija koštana oznaka za punkciju igle je L4 spinozni proces, koji se nalazi na raskrižju 'interkristalne' ili 'Tuffierove' linije (linija između vrha ilijskih grebena) i srednje linije kralježnice (Doherty and Forbes, 2014).

Uzorak CSF se treba zaštititi od svjetla i pravilno označiti u svrhu identifikacije. Uzorak bi se što prije trebao poslati do laboratorija, a preporuča se ručno dostavljanje (Doherty and Forbes, 2014).

1.6. Metode za određivanje biljega demencije u CSF

Za dijagnosticiranje biljega AD iz likvora preporuča se koristiti tehnologiju višestrukih ELISA mjerenja kod kojeg se istovremeno mjeri veći broj bioloških biljega (multiplex ELISA), u istom uzorku likvora. U današnje vrijeme Luminex xMAP tehnologija postaje sve popularnija za istovremeno određivanje vrijednosti A β 42, ukupnog Tau i pTau u likvoru, kao i drugih potencijalnih bioloških biljega (Šimić, 2018).

1.6.1 ELISA metoda određivanja biljega u likvoru

ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) je laboratorijski test koji se koristi za detekciju prisutnosti antigena ili antitijela u uzorku. Ovaj test temelji se na principu specifičnog vezanja antitijela za antigen, a zatim otkrivanju tog kompleksa koristeći enzimsku reakciju.

ELISA test može biti koristan u dijagnostici raznih stanja, uključujući infektivne bolesti, autoimune poremećaje, alergije i druge medicinske stanja. Također se može koristiti u

istraživanju biomarkera, analizi proteinskih interakcija, i u farmaceutskoj industriji za praćenje proizvodnje i kvalitete lijekova (Aydin, 2015).

Brojna istraživanja pokazuju da ELISA test za određivanje AD preko Tau, pTau i A β ima visoku specifičnost i osjetljivost veću od 85% pri usporedbi pacijenata s AD i bez AD (Eino Solje et al., 2021).

1.7. Cutoff ili granična vrijednost

Granična vrijednost (cutoff) odnosi se na određeni prag koji se koristi za odlučivanje o pozitivnosti ili negativnosti rezultata testa.

Primjerice, ako se testira prisutnost nekog biomarkera u uzorku krvi, granična vrijednost može se definirati kao minimalna koncentracija biomarkera koja ima kliničku značajnost. Ako koncentracija biomarkera u uzorku krvi premaši tu graničnu vrijednost, rezultat testa bit će pozitivan, što znači da je biomarker prisutan u tijelu u klinički značajnoj koncentraciji. Suprotno tome, ako je koncentracija ispod granične vrijednosti, rezultat testa bit će negativan.

Granična vrijednost se obično određuje na temelju medicinskih saznanja, istraživanja i kliničkih ispitivanja kako bi se postigla određena razina pouzdanosti i kliničke relevantnosti rezultata testa.

Kada je riječ o mjerenju za medicinske pretrage, granična vrijednost se često određuje u laboratorijskim postupcima. Nakon što se uzorak analizira, rezultati se uspoređuju s definiranom graničnom vrijednošću kako bi se donijela klinička interpretacija rezultata.

Statistička obrada podataka vrši se izračunom vrijednosti ROC krivulje. ROC krivulja je grafički prikaz omjera točno pozitivnih rezultata (osjetljivost) u odnosu na omjer lažno pozitivnih rezultata (100-specifičnost) za različite granične vrijednosti određenog parametra. Svaka točka na ROC krivulji predstavlja kombinaciju osjetljivosti i specifičnosti koja odgovara određenom pragu odluke. Područje ispod ROC krivulje (AUC) pokazatelj je sposobnosti parametra da razlikuje između dvije dijagnostičke skupine, odnosno bolesnih i zdravih.

Youdenov indeks (J) predstavlja jednu od ključnih sumarnih statistika ROC krivulje, koja se koristi za interpretaciju i procjenu učinkovitosti biomarkera. Ovaj indeks definira maksimalnu moguću učinkovitost biomarkera, a formalno se izražava kao $J = \max_c \{Se(c) + Sp(c) - 1\}$. Granična vrijednost koja ostvaruje taj maksimum naziva se optimalnom graničnom vrijednošću

(c^*) jer na najbolji način optimizira sposobnost biomarkera da razlikuje dvije skupine, pri čemu se jednaka važnost pridaje osjetljivosti i specifičnosti (Ruopp et al., 2008).

2.OBRAZLOŽENJE TEME

Za diferencijalnu dijagnozu AD se uz slikovne tehnike, najčešće određuju različiti biokemijski markeri u CSF. Kao najpouzdaniji biljezi pokazali su se Tau, pTau i A β 42 jer se njihove koncentracije mijenjaju u CSF kod bolesnika s AD puno prije pojave simptoma. Također se mijenjaju i prije promjena na mozgu koje se mogu detektirati slikovnim tehnikama kao što je MR (Savonenko et al., 2015).

Sama interpretacija izmjerenih vrijednosti pojedinog biljega je otežana zbog nepostojanja odgovarajućih referentnih vrijednosti za pojedinu populaciju bolesnika što je razumljivo zbog specifičnosti dobivanja uzorka CSF. Osim toga vrijednosti biljega mogu se značajno razlikovati ovisno o korištenom testu jer različiti proizvođači reagensa koriste drugačija antitijela za određivanje biljega demencije u svojim testovima.

Svrha ovog rada bila je utvrditi granične vrijednosti za biljeg demencije Tau, pTau i A β 42 izmjerene testovima proizvođača Eutoimmun iz Njemačke. Utvrđivanje točnih graničnih vrijednosti za korištene testove omogućuje bolje razlikovanje skupine pacijenata s AD od pacijenata s ostalim oblicima demencije. Također, u radu je ispitana i dijagnostička vrijednost svakog pojedinog biljega izmjerenog navedenim reagensom.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Uzorci i uzorkovanje

U radu su analizirani uzorci likvora dobiveni lumbalnom punkcijom koji su preostali nakon rutinske obrade. Uzorci likvora su centrifugirani i odvojeni od stanica unutar 4 sata od lumbalne punkcije.

Stabilnost uzorka je 48 sati na sobnoj temperaturi, a zamrzavanje neposredno nakon centrifugiranja daje mogućnost čuvanja od 2 mjeseca na -20°C ili dulje na -80°C .

Hemoragični uzorci nisu se uzimali u obradu zbog mogućeg utjecaja hemolize na rezultate.

Uzorci likvora prikupljeni su u polipropilenske spremnike jer se $\text{A}\beta$ apsorbira na druge površine.

U ovom radu obrađeno je ukupno 220 uzoraka likvora pacijenata iz cijele Hrvatske koji su nakon lumbalne punkcije poslani u Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku KBC Zagreb na analizu. Kod 166/220 pacijenata potvrđena je dijagnoza nekog oblika demencije, od čega je bilo 59 pacijenata s potvrđenom Alzheimerovom demencijom, 14 s miješanom demencijom, te 93 s ostalim demencijama ili drugim neurodegenerativnim bolestima. Kontrolnu skupinu činilo je 54 uzorka likvora pacijenata bez neurodegenerativnih bolesti.

3.2. Reagensi i potrebna oprema

Za određivanje biljega demencije korišteni su kompleti reagensa: Euroimmun Total-Tau, Euroimmun pTAU(181) i Euroimmun β -Amyloid(1-42). U svakom kompletu nalazi se mikrotitarska pločica, biotinom obilježeno antitijelo na antigen od interesa, enzimski konjugat, supstrat, stop otopina, pufer za ispiranje, standardi i kontrole. Stabilnost otvorenih i neotvorenih reagensa na $2-8^{\circ}\text{C}$ ograničena je rokom trajanja naznačenim na vanjskom pakiranju kompleta reagensa. Kalibratori i kontrole čuvaju se na -20°C i stabilni su do isteka roka trajanja. Nakon otvaranja mikrotitarska pločica je stabilna 4 tjedna na $2-8^{\circ}\text{C}$ ako je pakirana u aluminijsku foliju sa silikagelom.

Uz to korišteni materijali su: multipipeta, varijabilna automatska pipeta (2-20 μ L, 20-200 μ L, 100-1000 μ L) i zaštitna folija. Korišteni su uređaji vorteks i čitač ELISA pločica Sunrise.

3.3. Postupak

3.3.1. Načelo postupka

Enzimski imunotest na solidnoj fazi koristi imobilizirano monoklonsko protutijelo na antigen od interesa (Tau protein, pTau protein ili A β). U prvom reakcijskom koraku dodaje se uzorak likvora razrijeđen s biotinom obilježenim antitijelima na antigen od interesa. Kompleks antitijelo-antigen-antitijelo se detektira dodatkom streptavidina obilježenog peroksidazom. Nakon dodavanja supstrata razvija se obojenje koje je proporcionalno koncentraciji antigena u uzorku.

3.3.2. Predanalitička faza

Svi reagensi moraju biti na sobnoj temperaturi (+18°C do +25°C) oko 30 minuta prije početka rada. Sva razrijeđenija treba raditi u polipropilenskim epruvetama.

Točne koncentracije kalibratora i kontrola su ovisne o lotu i treba ih provjeriti prije početka rada kako bi se isprogramirao ELISA čitač.

Mikrotitarska pločica se mora stabilizirati na sobnoj temperaturi 30 min prije otvaranja aluminijske folije kako bi se spriječila kondenzacija. Nakon prvog otvaranja, jažice se mogu koristiti još 4 mjeseca, a čuvaju se na temperaturi od 2-8°C.

Kalibratori i kontrole se otope s 500 μ L destilirane vode 10 minuta prije korištenja i dobro promiješaju.

3.3.3. Analitička faza za određivanje Tau proteina

Prvo se pipetira multipipetom 100 μ L biotinom obilježenog antitijela na Tau protein u svaku jažicu. Onda se pipetira 25 μ L kalibratora, kontrola i uzoraka u prethodno odabrane jažice. Poslije se lagano protrese mikrotitarska pločica da se uzorci jednoliko raspodijele i prelijepi zaštitna folija.

Inkubacija je 180 min na sobnoj temperaturi.

Poslije inkubacije se ispiru 5x s 300 μ L pufera za ispiranje. Ostavi se pufer u jažicama 30-60 sekundi. Nakon ispiranja temeljito se odstrani pufer za ispiranje.

Potom se pipetira multipipetom 100 μ L enzimskog konjugata u sve jažice. Pokrije se plastičnom folijom i inkubira 30 minuta na sobnoj temperaturi.

Ponovno se pločica ispiru 5x s 300 μ L pufera za ispiranje. Opet se temeljito odstrani pufer za ispiranje.

Nakon toga se pipetira 100 μ L supstrata u sve jažice i inkubira 30 min na sobnoj temperaturi u tami i nakon isteka inkubacije dodaje se 100 μ L stop otopine i lagano promiješa.

Apsorbancije se čitaju na 450 nm, uz kontrolnu valnu duljinu na 650nm unutar 30 minuta na predefinjirano postavljenom programu.

3.3.4. Analitička faza za određivanje pTau proteina

Prvo se pipetira multipipetom 20 μ L biotinom obilježenog antitijela na Tau protein u svaku jažicu. Onda se pipetira 80 μ L kalibratora, kontrola i uzoraka u prethodno odabrane jažice. Poslije se lagano protrese mikrotitarska pločica da se uzorci jednoliko raspodijele i prelijepi zaštitna folija.

Inkubacija je 180 min na sobnoj temperaturi.

Poslije inkubacije se ispiru 5x s 300 μ L pufera za ispiranje. Ostavi se pufer u jažicama 30-60 sekundi. Nakon ispiranja temeljito se odstrani pufer za ispiranje.

Potom se pipetira multipipetom 100 μ L enzimskog konjugata u sve jažice. Pokrije se plastičnom folijom i inkubira 30 minuta na sobnoj temperaturi.

Ponovno se pločica ispiru 5x s 300 μ L pufera za ispiranje. Opet se temeljito odstrani pufer za ispiranje.

Nakon toga se pipetira 100 μ L supstrata u sve jažice i inkubira 30 min na sobnoj temperaturi u tami i nakon isteka inkubacije dodaje se 100 μ L stop otopine i lagano promiješa.

Apsorbancije se čitaju na 450 nm, uz kontrolnu valnu duljinu na 650nm unutar 30 minuta na predefiniрано postavljenom programu.

3.3.5. Analitička faza za određivanje beta amiloida

Prvo se pipetira multipipetom 100 μ L biotinom obilježenog antitijela na Tau protein u svaku jažicu. Onda se pipetira 15 μ L kalibratora, kontrola i uzoraka u prethodno odabrane jažice. Poslije se lagano protrese mikrotitarska pločica da se uzorci jednoliko raspodijele i prelijepi zaštitna folija.

Inkubacija je 180 min na sobnoj temperaturi.

Poslije inkubacije se ispire 5x s 300 μ L pufera za ispiranje. Ostavi se pufer u jažicama 30-60 sekundi. Nakon ispiranja temeljito se odstrani pufer za ispiranje.

Potom se pipetira multipipetom 100 μ L enzimskog konjugata u sve jažice. Pokrije se plastičnom folijom i inkubira 30 minuta na sobnoj temperaturi.

Ponovno se pločica ispire 5x s 300 μ L pufera za ispiranje. Opet se temeljito odstrani pufer za ispiranje.

Nakon toga se pipetira 100 μ L supstrata u sve jažice i inkubira 30 min na sobnoj temperaturi u tami i nakon isteka inkubacije dodaje se 100 μ L stop otopine i lagano promiješa.

Apsorbancije se čitaju na 450 nm, uz kontrolnu valnu duljinu na 650nm unutar 15 minuta na predefiniрано postavljenom programu.

3.4. Postanalitičke metode

3.4.1. Izračun rezultata

Koncentracije biljega se izračunaju putem ELISA čitača pločica koji očita apsorbanciju unutar pojedine jažice ELISA pločice s uzorcima. Koncentracije pojedinog biljega dobiju se direktno s ELISA čitača automatskim izračunom iz kalibracijske krivulje.

3.4.2. Statistički testovi

Statistički testovi su napravljeni u programu MedCalc (24. Svibnja 2023., MedCalc® Statistical Software version 22.001).

Za određivanje osjetljivosti i specifičnosti i ukupne dijagnostičke točnosti testova korištena je ROC krivulja. Uz to su korišteni i statistički testovi: Kruskal-Wallis test, post-hoc analiza i Mann-Whitney test za određivanje dijagnostičke vrijednosti pojedinih biljega u dijagnostici Alzheimerove demencije u odnosu na kontrolnu skupinu.

4. REZULTATI

U ovom radu analizirani su uzorci likvora od 220 pacijenata koji su podijeljeni u 4 skupine; skupina pacijenata kojima je dijagnosticirana Alzheimerova demencija (AD), skupina pacijenata kojima je dijagnosticirana miješana demencija (MD), pacijenti s dijagnosticiranim ostalim demencijama ili drugim neurodegenerativnim bolestima (OD) i pacijenti kontrolne skupine bez neurodegenerativnih bolesti (CTRL). Usporedba je napravljena za sve četiri skupine, a posebno je napravljena usporedba Alzheimerove demencije s kontrolnom skupinom.

4.1. ROC krivulje

Određivanje graničnih vrijednosti za tri biljega demencije: Tau proteina, pTau proteina i A β 42 napravljeno je pomoću ROC krivulja. Analizirane su vrijednosti biljega u ukupno 220 uzoraka pacijenata čije su dijagnoze prikazane u Tablici 1.

Tablica 1. Skupine bolesnika u kojima su analizirane vrijednosti biljega demencije

Ukupan broj uzoraka	220
AD+MD	73 (33,18%)
CTRL+OD	147 (66,82%)
Učestalost bolesti (%)	33,2

*AD- skupina s Alzheimerovom demencijom, MD- skupina s miješanom demencijom, OD- skupina s ostalim demencijama i neurodegenerativnim bolestima, CTRL- kontrolna skupina

U računanje granične vrijednosti uz pomoć ROC krivulje uz AD skupinu je dodana i MD skupina zbog toga što se i u njoj nalaze pacijenti s Alzheimerovom demencijom i s time statistički pridonose određivanju granične vrijednosti uz AD skupinu.

4.1.1. Analiza ROC krivulje za Tau protein

U Tablici 2. prikazani su rezultati ROC analize za Tau protein.

Tablica 2. Rezultati analize ROC krivulje za Tau protein

Area under the ROC curve (AUC)	0,700
Standard Error ^a	0,0369
95% Confidence interval ^b	0,634 to 0,759
z statistic	5,406
Significance level P (Area=0.5)	<0,0001

^a DeLong et al., 1988

^b Binomial exact

Tablica 3. Youdenov indeks za Tau protein

Youden index J	0,3927
Cutoff	>414
Osjetljivost	72,60
Specifičnost	66,67

4.1.2. Analiza ROC krivulje za pTau protein

U Tablici 4. prikazani su rezultati analize ROC krivulje za pTau protein.

Tablica 4. Rezultati analize ROC krivulje za pTau protein

Area under the ROC curve (AUC)	0,868
Standard Error ^a	0,0296
95% Confidence interval ^b	0,816 to 0,909
z statistic	12,410
Significance level P (Area=0.5)	<0,0001

^a DeLong et al., 1988

^b Binomial exact

Tablica 5. Youdenov indeks za pTau protein

Youden index J	0,7063
Cutoff	>71
Osjetljivost	82,19
Specifičnost	88,44

4.1.3. Analiza ROC krivulje za beta-amiloid(1-42)

U Tablici 6. prikazani su rezultati analize ROC krivulje za A β 42.

Tablica 6. Površina ispod ROC krivulje (AUC) za A β 42

Area under the ROC curve (AUC)	0,785
Standard Error ^a	0,0307
95% Confidence interval ^b	0,724 to 0,837
z statistic	9,280
Significance level P (Area=0.5)	<0,0001

^a DeLong et al., 1988

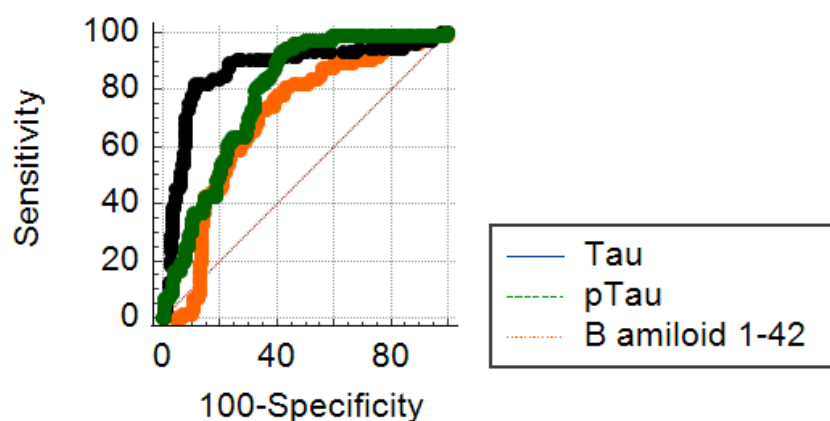
^b Binomial exact

Tablica 7. Youdenov indeks za A β 42

Youden index J	0,5166
Cutoff	≤734
Osjetljivost	94,52
Specifičnost	57,14

4.1.4. Usporedba ROC krivulja

Na slici 2 prikazana je usporedba ROC krivulja za ispitivane biljege demencije. Rezultati su pokazali značajnu dijagnostičku vrijednost za sva tri biomarkera, s varijacijama u njihovoj sposobnosti da precizno razlikuju pozitivne od negativnih slučajeva. PTau se pokazao kao biomarker s najboljom dijagnostičkom sposobnosti od tri prikazana biomarkera.



Slika 2. Usporedba ROC krivulja za Tau, pTau i A β 42

4.2. Statistička analiza dijagnostičke osjetljivosti i specifičnosti Tau proteina za određivanje Alzheimerove demencije

Kruskal-Wallis test korišten je za usporedbu koncentracija Tau proteina među četiri skupine: AD, CTRL, MD i OD. Rezultati Kruskal-Wallis testa pokazali su značajne razlike u koncentracijama Tau proteina među skupinama.

Tablica 8. Rezultati Kruskal-Wallis testa za Tau protein za razlike između AD, CTRL, MD i OD skupina

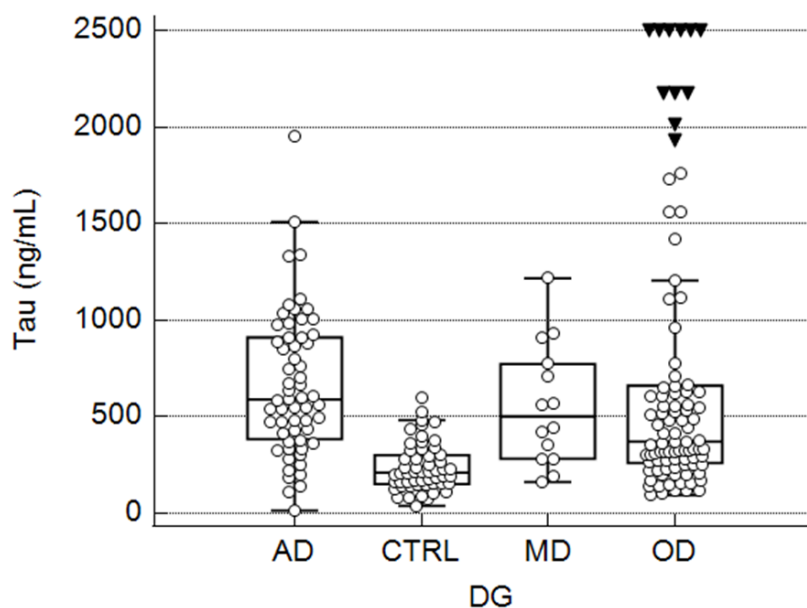
Test statistic	54,3232
Corrected for ties	54,3256
Degrees of Freedom (DF)	3
Significance level	P < 0,000001

Kako bismo identificirali specifične razlike između skupina, provedena je post-hoc analiza korištenjem Conoverovog testa. Rezultati su prikazani u Tablici 9.

Tablica 9. Rezultati post-hoc (Conover) analize za Tau protein između AD, CTRL, MD i OD skupina

Factor	n	Average Rank	Different (P<0,05) from factor nr
(1) AD	59	142,63	(2)(4)
(2) CTRL	54	57,87	(1)(3)(4)
(3) MD	14	128,18	(2)
(4) OD	93	118,02	(1)(2)

*AD- skupina s Alzheimerovom demencijom, MD- skupina s miješanom demencijom, OD- skupina s ostalim demencijama i neurodegenerativnim bolestima, CTRL- kontrolna skupina



Slika 3. Graf višestrukih usporedbi Tau proteina između skupina AD, CTRL, MD i OD skupina

Za dodatno ispitivanje razlika između kontrolne skupine (CTRL+MD+OD) i skupine s Alzheimerovom demencijom (AD), proveden je Mann-Whitney test.

Tablica 10. Tablica podataka za Mann-Whitney test za Tau protein između skupina AD i CTRL, MD, OD

	CTRL+OD+MD	AD
Sample size	147	73
Lowest value	39,0000	15,0000
Highest value	2500,0000	1956,0000
Median	311,0000	567,0000
95% CI for the median	273,5500 to 334,7250	482,2712 to 706,3830
Interquartile range	197,5000 to 526,5000	366,7500 to 908,2500

Hodges-Lehmann median difference	226,0000
95% Confidence interval	137,0000 to 314,0000

Rezultati Mann-Whitney testa pokazuju značajnu razliku između kontrolne skupine i skupine s Alzheimerovom demencijom u koncentracijama Tau proteina.

Tablica 11. Rezultati Mann-Whitney testa za Tau protein između AD i CTRL, MD, OD skupina

Average rank of first group	95,9218
Average rank of second group	139,8562
Mann-Whitney U	3222,50
Test statistic Z	-4,821
Two-tailed probability	P < 0,0001

4.3. Statistička analiza dijagnostičke osjetljivosti i specifičnosti pTau proteina za određivanje Alzheimerove demencije

Kruskal-Wallis test korišten je za usporedbu koncentracijama pTau proteina među četiri skupine: AD, CTRL, MD i OD. Rezultati Kruskal-Wallis testa pokazali su značajne razlike u koncentracijama pTau proteina među skupinama:

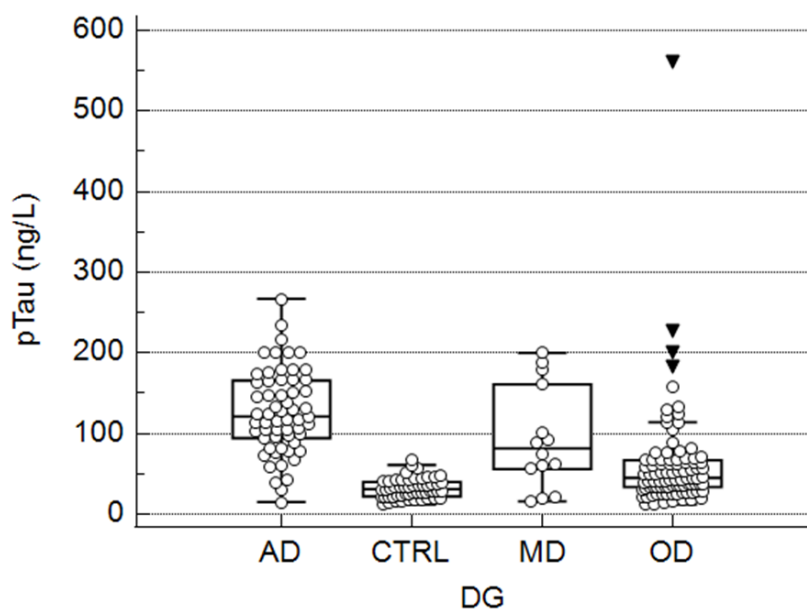
Tablica 12. Rezultati Kruskal-Wallis testa za pTau protein u skupinama AD, CTRL, MD i OD

Test statistic	97,8383
Corrected for ties	97,8590
Degrees of Freedom (DF)	3
Significance level	P < 0,000001

Za identificiranje specifične razlike između skupina, provedena je post-hoc analiza korištenjem Conoverovog testa. Rezultati su prikazani u tablici 13.

Tablica 13. Rezultati post-hoc (Conover) analize pTau proteina u skupinama AD, CTRL, MD i OD

Factor	n	Average Rank	Different (P<0,05) from factor nr
(1) AD	59	171,87	(2)(3)(4)
(2) CTRL	54	56,97	(1)(3)(4)
(3) MD	14	133,64	(1)(2)(4)
(4) OD	93	99,16	(1)(2)(3)



Slika 4. Graf višestruke usporedbe pTau proteina između skupina AD, CTRL, MD i OD skupine

Za dodatno ispitivanje razlika između kontrolne skupine (CTRL+OD+MD) i skupine s Alzheimerovom demencijom (AD), proveden je Mann-Whitney test.

Tablica 14. Podaci za Mann-Whitney test za pTau protein između AD i CTRL, MD, OD skupina

	CTRL+OD+MD	AD
Sample size	147	73
Lowest value	12,0000	15,0000
Highest value	561,0000	267,0000
Median	38,0000	116,0000
95% CI for the median	35,0000 to 42,0000	102,6542 to 132,0373
Interquartile range	26,2500 to 56,0000	81,0000 to 165,2500

Hodges-Lehmann median difference	73,0000
95% Confidence interval	61,0000 to 85,0000

Rezultati Mann-Whitney testa pokazuju značajnu razliku između kontrolne skupine i skupine s Alzheimerovom demencijom u koncentracijama pTau proteina:

Tablica 15. Rezultati Mann-Whitney testa za pTau protein između AD i CTRL, MD, OD skupina

Average rank of first group	83,6633
Average rank of second group	164,5411
Mann-Whitney U	1420,50
Test statistic Z	-8,875
Two-tailed probability	P < 0,0001

4.4. Statistička analiza dijagnostičke osjetljivosti i specifičnosti beta-amiloida (1-42) za određivanje Alzheimerove demencije

Kruskal-Wallis test korišten je za usporedbu koncentracija A β 42 među četiri skupine: AD, CTRL, MD i OD. Rezultati Kruskal-Wallis testa pokazali su značajne razlike u koncentracijama A β 42 među skupinama:

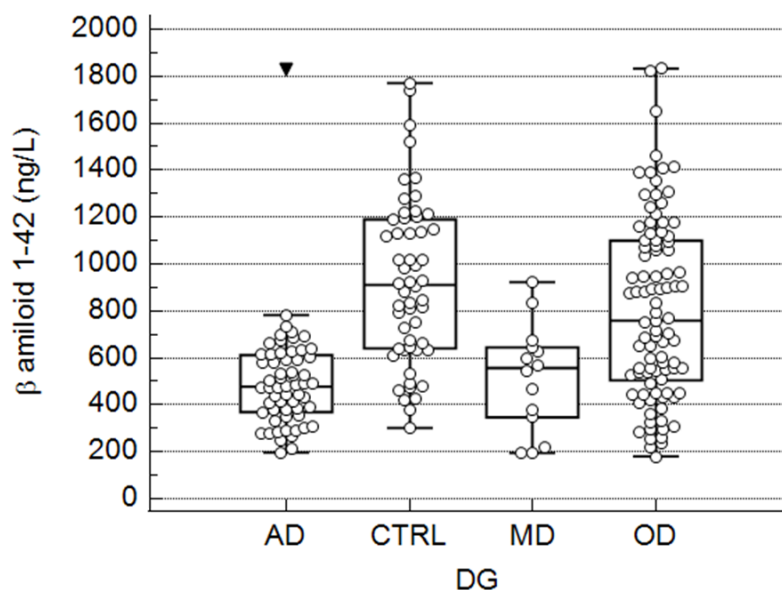
Tablica 16. Rezultati Kruskal-Wallis testa za A β 42 između AD, CTRL, MD i OD skupina

Test statistic	51,5165
Corrected for ties	51,5172
Degrees of Freedom (DF)	3
Significance level	P < 0,000001

Kako bismo identificirali specifične razlike između skupina, provedena je post-hoc analiza korištenjem Conoverovog testa. Rezultati su prikazani u Tablici 17.

Tablica 17. Rezultati post-hoc (Conover) analize A β 42 između AD, CTRL, MD i OD skupina

Factor	n	Average Rank	Different (P<0,05) from factor nr
(1) AD	59	67,29	(2)(4)
(2) CTRL	54	145,38	(1)(3)(4)
(3) MD	14	74,50	(2)(4)
(4) OD	93	123,08	(1)(2)(3)



Slika 5. Graf višestruke usporedbe A β 42 između AD, CTRL, MD i OD skupina

Za dodatno ispitivanje razlika između kontrolne skupine (CTRL+OD+MD) i skupine s Alzheimerovom demencijom (AD), proveden je Mann-Whitney test.

Tablica 18. Podaci za Mann-Whitney test za A β 42 između AD i CTRL, MD, OD skupina

	CTRL+MD+OD	AD
Sample size	147	73
Lowest value	180,0000	195,0000
Highest value	1833,0000	1826,0000
Median	835,0000	486,0000
95% CI for the median	719,3751 to 916,9374	437,2712 to 539,1118
Interquartile range	547,7500 to 1133,0000	363,7500 to 617,7500

Hodges-Lehmann median difference	-337,0000
95% Confidence interval	-437,0000 to -242,0000

Rezultati Mann-Whitney testa pokazuju značajnu razliku između kontrolne skupine i skupine s Alzheimerovom demencijom u koncentracijama A β 42:

Tablica 19. Rezultati Mann-Whitney testa za A β 42 između AD i CTRL, MD, OD skupina

Average rank of first group	131,2721
Average rank of second group	68,6712
Mann-Whitney U	2312,00
Test statistic Z	-6,869
Two-tailed probability	P < 0,0001

5. RASPRAVA

U radu su analizirane vrijednosti biljega koji se danas rutinski određuju u likvoru i koriste u diferencijalnoj dijagnostici demencija: Tau proteina, pTau proteina i A β 42 sa svrhom određivanja graničnih vrijednosti tih biljega. Sva tri biljega određivana su reagensima proizvođača Euroimmun, Njemačka.

Za precizno određivanje tri navedena biljega demencije ključna je pravilna predanalitika. Osim način uzorkovanja i volumena likvora vrlo veliku važnost za dobivanje točnih rezultata ima vrsta materijala od kojeg su napravljene epruvete za prikupljanje uzoraka. Preporučuje se da CSF bude u dodiru s polipropilenom (PP) ili materijalima s niskim vezanjem proteina (Lobind). Treba izbjegavati staklo, polistiren (PS) i polietilen (PE) jer mogu dati lažno pozitivne rezultate. Također, važno je prikupljati dovoljno uzorka kako bi se izbjegli netočni rezultati. Također je iznimno važan način transporta do laboratorija pošto drmanje epruvete i nagli pokreti mogu uzrokovati hemolizu koja interferira s analizom likvora i daje pogrešne rezultate (Doherty and Forbes, 2014).

Da bi se donijele učinkovite kliničke odluke, potrebni su odgovarajući referentni intervali. Oni se obično dobivaju iz studija na zdravoj populaciji, no invazivnost uzorkovanja likvora otežava provođenje takvih studija. Stoga se referentni intervali za CSF često preuzimaju iz knjiga ili drugih vanjskih izvora. Ovi izvori često koriste starije studije koje mogu imati tehnološke i populacijske razlike, ne dijele referentne intervale prema dobi ili spolu, ili imaju male uzorke, što ih čini manje optimalnima za aktualnu populaciju (McCudden et al., 2017).

Osim toga, vrijednosti biljega mogu se značajno razlikovati ovisno o korištenom testu jer različiti proizvođači reagensa koriste drugačija antitijela za određivanje biljega demencije u svojim testovima. Zbog toga se u ovom radu analiziralo vrijednosti tri biljega dobivene testom proizvođača Euroimmun kako bismo utvrdili granične vrijednosti svakog biljega za postavljanje dijagnoze Alzheimerove demencije u populaciji upravo za ovaj reagens.

Analizom ROC krivulja dobivene su sljedeće vrijednosti za pojedini biljeg: za Tau protein je <414 ng/L, za pTau je <71 ng/L i za A β 42 je >734 ng/L. Iz ovih rezultata se vidi da je statistički dokazano da osobe, čije su vrijednosti biljega veće od 414 ng/L za Tau i 71 ng/L za pTau protein i manje od 734 ng/L za A β 42, imaju potvrđenu dijagnozu Alzheimerove demencije. Točnost ovih graničnih vrijednosti prikazana je u Tablicama 2, 4 i 6.

Rezultati statističke analize potvrđuju da su koncentracije Tau i pTau proteina značajno više kod pacijenata s Alzheimerovom demencijom u usporedbi s kontrolnom skupinom i da su koncentracije A β 42 značajno niže u pacijenata s Alzheimerovom demencijom u usporedbi s kontrolnom skupinom, što podržava korištenje Tau, pTau i A β 42 kao biomarkera za dijagnosticiranje Alzheimerove demencije. Osim toga, pokazano je da pTau, od tri navedena biljega, ima najbolju dijagnostičku vrijednost.

Također su analize ROC krivulja pokazale da biljezi Tau, pTau i A β 42 imaju dobar odnos između osjetljivosti i specifičnosti, gdje pTau ima najbolje rezultate.

Post-hoc analiza pokazala je da su koncentracije Tau proteina značajno više u skupini AD u usporedbi s kontrolnom skupinom i skupinom OD. Za pTau post-hoc analiza pokazala je da su koncentracije proteina značajno više u skupini AD u usporedbi s kontrolnom skupinom, skupinom MD i skupinom OD. Također, post-hoc analiza pokazala je da su koncentracije A β 42 značajno niže u skupini AD u usporedbi sa skupinom CTRL i skupinom OD.

Kruskal-Wallis test korišten je za usporedbu koncentracija biljega između četiri skupine: AD, CTRL, MD i OD. Rezultati Kruskal-Wallis testa pokazali su značajne razlike u koncentracijama Tau proteina među tim skupinama. Mann-Whitney test korišten je za određivanje razlike između kontrolne skupine i skupine s Alzheimerovom demencijom. Rezultati Mann-Whitney testa za Tau protein pokazuju značajnu razliku između kontrolne skupine i skupine s Alzheimerovom demencijom u koncentracijama Tau proteina.

Rezultati Kruskal-Wallis testa za pTau protein pokazali su značajne razlike u koncentracijama pTau proteina među analiziranim skupinama. Rezultati Mann-Whitney testa pokazuju značajnu razliku između kontrolne skupine i skupine s Alzheimerovom demencijom u koncentracijama pTau proteina.

Rezultati Kruskal-Wallis testa za A β 42 pokazali su značajne razlike u koncentracijama između analiziranih skupina. Rezultati Mann-Whitney testa pokazuju značajnu razliku između kontrolne skupine i skupine s Alzheimerovom demencijom u koncentracijama A β 42.

Ovi rezultati podudaraju se sa poznatim podacima iz literatura za određivanje AD iz likvora određivanjem biljega Tau, pTau i A β 42 (Anja Hviid Simonsen et al., 2016).

6. ZAKLJUČAK

Na temelju analize rezultata za Tau protein, pTau i A β 42, možemo zaključiti sljedeće:

1. U skupini pacijenata s Alzheimerovom demencijom dobivene su značajno više koncentracije Tau proteina i pTau u usporedbi s kontrolnom skupinom i ostalim skupinama s kognitivnim oštećenjima.

2. U skupini pacijenata s Alzheimerovom demencijom dobivene su značajno niže vrijednosti A β 42 u usporedbi s kontrolnom skupinom i ostalim skupinama pacijenata.

3. Primjenom statističkih testova (ROC krivulje) dobivene su granične vrijednosti za Tau protein <414 ng/L za pTau protein, <71 ng/L i za A β 42 >734 ng/L. Analizom ROC krivulje pokazano je i da biljezi imaju dobar odnos osjetljivosti i specifičnosti.

4. Dobiveni rezultati potvrđuju da su Tau protein, pTau i A β 42 korisni biomarkeri za dijagnostiku Alzheimerove demencije, s potencijalom da doprinesu poboljšanju dijagnostičke točnosti, posebice pTau protein.

7. POPIS KRATICA

AD- Alzheimerova demencija (*engl. Alzheimer dementia*)

A β - beta-amiloid (*engl. beta-amyloid*)

A β 42- beta-amiloid (1-42) (*engl. beta-amyloid (1-42)*)

A β 40- beta-amiloid (1-40) (*engl. beta-amyloid (1-40)*)

APP- beta-amiloid prekursor proteina (*engl. Amyloid Precursor Protein*)

AUC- površina ispod ROC krivulje (*engl. Area under the ROC curve*)

CT- kompjutorizirana tomografija (*engl. Computed tomography*)

CTRL- kontrolna skupina (*engl. Control group*)

CSF- cerebrospinalna tekućina (*engl. Cerebrospinal fluid*)

ELISA- Imunosorbentni test povezan s enzimom (*engl. enzyme-linked Immunosorbent Assay*)

fMR- funkcionalna magnetska rezonancija (*engl. Functional Magnetic Resonance*)

KBC- Klinički bolničku centar (*engl. Clinical Hospital Center*)

MD- miješana demencija (*engl. Mixed dementia*)

MMSE- kratki pregled mentalnog stanja (*engl. Mini-Mental State Examination*)

MR- magnetska rezonancija (*engl. Magnetic Resonance*)

Lobind- materijal s niskim vezanjem proteina (*engl. Low Protein Binding*)

OD- ostale demencija ili neurodegenerativne bolesti (*engl. other dementias or neurodegenerative illnesses*)

PE- polietilen (*engl. polyethylene*)

PET- pozitronska emisijska tomografija (*engl. Positron Emission Tomography*)

PP- polipropilen (*engl. polypropylene*)

PS- polistiren (*engl. polystyrene*)

pTau- fosforilirani Tau protein (*engl. phosphorylated Tau protein*)

ROC krivulja- krivulja operativnih karakteristika prijemnika (*engl. Receiver Operating Characteristic*)

SPECT- kompjutorizirana tomografija s jednom fotonskom emisijom (*engl. Single Photon Emission Computed Tomography*)

SŽS- središnji živčani sustav (*engl. Central nervous system, CNS*)

8. LITERATURA

1. Alzheimer's Association (2021). *Tau*. [online] Dostupno na: <https://www.alz.org/media/documents/alzheimers-dementia-tau-ts.pdf> (Pristupljeno 13.Ruj. 2024.)
2. Anja Hviid Simonsen, Sanna-Kaisa Herukka, Andreasen, N., Baldeiras, I., Bjerke, M., Kaj Blennow, Sebastiaan Engelborghs, Frisoni, G.B., Tomasz Gabryelewicz, Galluzzi, S., Handels, R., Kramberger, M.G., Agnieszka Kulczyńska, Jose Luis Molinuevo, Mroczko, B., Nordberg, A., Catarina Resende Oliveira, Otto, M., Rinne, J.O. and Rot, U. (2016). Recommendations for CSF AD biomarkers in the diagnostic evaluation of dementia. *Alzheimer's & dementia*, [online] 13(3), pp.274–284 doi:<https://doi.org/10.1016/j.jalz.2016.09.008>. (Pristupljeno 13. Ruj. 2024.)
3. Aydin, S. (2015). A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. *Peptides*, [online] 72, pp.4–15.) doi:<https://doi.org/10.1016/j.peptides.2015.04.012>. (Pristupljeno 13. Ruj. 2024.)
4. Bivona, G., Iemmolo, M. and Ghersi, G. (2023). Cerebrospinal and Blood Biomarkers in Alzheimer's Disease: Did Mild Cognitive Impairment Definition Affect Their Clinical Usefulness? *International Journal of Molecular Sciences*, [online] 24(23), pp.16908–16908.) doi:<https://doi.org/10.3390/ijms242316908>. (Pristupljeno 13. Ruj. 2024.)
5. Bruun, M., Hanneke F.M. Rhodius-Meester, Juha Koikkalainen, Baroni, M., Gjerum, L., Lemstra, A.W., Frederik Barkhof, Remes, A.M., Timo Urhema, Tolonen, A., Rueckert, D., Mark van Gils, Frederiksen, K.S., Waldemar, G., Scheltens, P., Patrizia Mecocci, Hilikka Soinen, Jyrki Lötjönen, Hasselbalch, S.G. and van (2018). Evaluating combinations of diagnostic tests to discriminate different dementia types. *Alzheimer's & Dementia: Diagnosis, Assessment & Disease Monitoring*, [online] 10(1), (pp.509–518.) doi:<https://doi.org/10.1016/j.dadm.2018.07.003>. (Pristupljeno 13. Ruj. 2024.)
6. Chouraki, V. and Seshadri, S. (2014). Genetics of Alzheimer's Disease. *Advances in Genetics*

7. Doherty, C.M. and Forbes, R.B. (2014). Diagnostic Lumbar Puncture. *The Ulster medical journal*, [online] 83(2), (pp.93–102.) Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4113153/> (Pristupljeno 19 Velj. 2024.)
8. Dukić, L. (2016). *Značajnost koncentracije neurozina i klasterina u diferencijalnoj dijagnostici demencija*. [online] Unizg.hr. Dostupno na: <https://repositorij.pharma.unizg.hr/islandora/object/pharma:503> (Pristupljeno 15 Velj. 2024.)
9. Eino Solje, Benussi, A., Buratti, E., Remes, A.M., Annakaisa Haapasalo and Borroni, B. (2021). State-of-the-Art Methods and Emerging Fluid Biomarkers in the Diagnostics of Dementia—A Short Review and Diagnostic Algorithm. *Diagnostics*, [online] 11(5), pp.788–788.) doi:<https://doi.org/10.3390/diagnostics11050788>. (Pristupljeno 13. Ruj. 2024.)
10. Feldman, H.H., Jacova, C., Robillard, A., Garcia, A., Chow, T., Borrie, M., Schipper, H.M., Blair, M., Kertesz, A. and Chertkow, H. (2008). Diagnosis and treatment of dementia: 2. Diagnosis. *Canadian Medical Association Journal*, [online] 178(7), (pp.825–836.) doi:<https://doi.org/10.1503/cmaj.070798>. (Pristupljeno 13. Ruj. 2024.)
11. Guendouzi, J. and Savage, M. (2017). Alzheimer's Dementia. *Perspectives in pragmatics, psychology & philosophy*
12. Haut, F., Argyrousi, E.K. and Arancio, O. (2023). Re-Arranging the Puzzle between the Amyloid-Beta and Tau Pathology: An APP-Centric Approach. *International Journal of Molecular Sciences*, [online] 25(1), (pp.259–259.)doi:<https://doi.org/10.3390/ijms25010259>. (Pristupljeno 13. Ruj. 2024.)
13. Hayrettin Tumani, Huss, A. and Bachhuber, F. (2018). The cerebrospinal fluid and barriers – anatomic and physiologic considerations. *Handbook of clinical neurology*
14. Hickey, E. and Bourgeois, M.S. eds., 2011. *Dementia: From diagnosis to management-A functional approach*. Taylor & Francis, (pp.9-31.)

15. K.A. Jellinger and J. Attems (2007). Neuropathological evaluation of mixed dementia. *Journal of the Neurological Sciences*, [online] 257(1-2), (pp.80–87.) doi:<https://doi.org/10.1016/j.jns.2007.01.045>. (Pristupljeno 13. Ruj. 2024.)
16. Maho Morishima-Kawashima and Ihara, Y. (2002). Alzheimer's disease: β -Amyloid protein and tau. *Journal of Neuroscience Research*, [online] 70(3), (pp.392–401.) doi:<https://doi.org/10.1002/jnr.10355>. (Pristupljeno 13. Ruj. 2024.)
17. Mandelkow, E.-M. (2012). Biochemistry and Cell Biology of Tau Protein in Neurofibrillary Degeneration. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, [online] 2(7), (pp.a006247–a006247.) doi:<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006247>. (Pristupljeno 13. Ruj 2024)
18. Mayo Clinic. (2023). *Alzheimer's disease - Symptoms and causes*. [online] Dostupno na: <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/alzheimers-disease/symptoms-causes/syc-20350447> (Pristupljeno 10. Velj. 2024.)
19. McCudden, C.R., Brooks, J., Priya Figurado and Bourque, P.R. (2017). Cerebrospinal Fluid Total Protein Reference Intervals Derived from 20 Years of Patient Data. *Clinical Chemistry*, [online] 63(12), (pp.1856–1865.) doi:<https://doi.org/10.1373/clinchem.2017.278267>. (Pristupljeno 13.Ruj. 2024.)
20. Medeiros, R., Baglietto-Vargas, D. and LaFerla, F.M. (2011). The Role of Tau in Alzheimer's Disease and Related Disorders. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, [online] 17(5), (pp.514–524.) doi:<https://doi.org/10.1111/j.1755-5949.2010.00177.x>. (Pristupljeno 13. Ruj. 2024.)
21. Orellana, A., García-González, P., Valero, S., Montreal, L., Itziar de Rojas, Hernández, I., Maitee Rosende-Roca, Vargas, L., Juan Pablo Tartari, Ester Esteban-De Antonio, Urszula Bojaryn, Leire Narvaiza, Alarcón-Martín, E., Montserrat Alegret, Alcolea, D., Lleó, A., Lluís Tàrraga, Pytel, V., Cano, A. and Marquié, M. (2022). Establishing In-House Cutoffs of CSF Alzheimer's Disease Biomarkers for the AT(N) Stratification of the Alzheimer Center Barcelona

Cohort. *International Journal of Molecular Sciences*, [online] 23(13), (pp.6891–6891.) doi:<https://doi.org/10.3390/ijms23136891>. (Pristupljeno 13.Ruj.2024.)

22. Perneczky. Dementia treatment versus prevention. (2019). *Dialogues in Clinical Neuroscience*, (pp.43-51.)

23. Renpei Sengoku (2019). *Aging and Alzheimer's disease pathology. Neuropathology*, [online] 40(1), (pp.22–29.) doi:<https://doi.org/10.1111/neup.12626>. (Pristupljeno 13. Ruj. 2024.)

24. Roda, A., Serra-Mir, G., Laia Montoliu-Gaya, Tiessler, L. and Villegas, S. (2022). Amyloid-beta peptide and tau protein crosstalk in Alzheimer's disease. *Neural Regeneration Research*, [online] 17(8), (pp.1666–1666.) doi:<https://doi.org/10.4103/1673-5374.332127>. (Pristupljeno 13. Ruj. 2024.)

25. Roher, A.E., Lowenson, J.D., Clarke, S., Woods, A.S., Cotter, R.J., Gowing, E. and Ball, M.J. (1993). beta-Amyloid-(1-42) is a major component of cerebrovascular amyloid deposits: implications for the pathology of Alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, [online] 90(22), (pp.10836–10840.) doi:<https://doi.org/10.1073/pnas.90.22.10836>. (Pristupljeno 13. Ruj. 2024.)

26. Ruopp, M.D., Perkins, N.J., Whitcomb, B.W. and Schisterman, E.F. (2008). Youden Index and Optimal Cut-Point Estimated from Observations Affected by a Lower Limit of Detection. *Biometrical Journal*, [online] 50(3), (pp.419–430.) doi:<https://doi.org/10.1002/bimj.200710415>. (Pristupljeno 13. Ruj. 2024.)

27. Savonenko, A.V., Melnikova, T., Li, T., Price, D.L. and Wong, P.C. (2015). *Alzheimer Disease*.

28. Song, C., Shi, J., Zhang, P., Zhang, Y., Xu, J., Zhao, L., Zhang, R., Wang, H. and Chen, H. (2022). Immunotherapy for Alzheimer's disease: targeting β -amyloid and beyond. *Translational neurodegeneration*, [online] 11(1). doi:<https://doi.org/10.1186/s40035-022-00292-3>. (Pristupljeno 13. Ruj. 2024.)

29. Šimić, G. (2018). Likvorski biomarkeri u dijagnostici Alzheimerove bolesti. *Croris.hr*, [online] pp.1–1. Dostupno na: <https://www.croris.hr/crosbi/publikacija/prilog-skup/687763> (Pristupljeno 26. Lip. 2024.)

9. SAŽETAK

U ovom diplomskom radu analizirane su koncentracije Tau proteina, fosforiliranog Tau proteina i A β 42 u cerebrospinalnoj tekućini pacijenata s različitim oblicima demencija, kao i u kontrolnoj skupini. Određivanje ovih biomarkera ključno je za rano otkrivanje, praćenje i potvrdu Alzheimerove demencije. Cilj rada bio je odrediti granične vrijednosti za sva tri biljega za testove proizvođača Euroimmun iz Njemačke te ispitati dijagnostičku vrijednost svakog pojedinog biljega.

Istraživanje je provedeno na skupini od 220 ispitanika s ranije utvrđenim dijagnozama, a skupina je obuhvaćala 59 pacijenata s potvrđenom Alzheimerovom demencijom, 14 s miješanom demencijom, 93 s ostalim demencijama ili neurodegenerativnim bolestima te 54 pacijenata bez dokazane neurodegenerativne bolesti koji su predstavljali kontrolnu skupinu.

Statističkom analizom rezultata dobivene su granične vrijednosti za Tau protein <414 ng/L, za pTau protein <71 ng/L i za A β 42 >734 ng/L. Analizom ROC krivulje pokazano je i da biljezi imaju dobar odnos osjetljivosti i specifičnosti.

Također, dobiveni rezultati potvrdili su dijagnostičku vrijednost navedena tri biljega za razlikovanje Alzheimerove demencije od ostalih oblika demencije pri čemu se kao najpouzdaniji biljeg pokazao pTau protein.

SUMMARY

In this thesis, the concentrations of Tau protein, phosphorylated Tau protein, and A β 42 were analyzed from the cerebrospinal fluid of patients with various forms of dementia as well as in a control group. Determining these biomarkers is crucial for the early detection, monitoring, and confirmation of Alzheimer's dementia. The aim of the study was to establish cutoff values for all three biomarkers using tests from the Euroimmun manufacturer in Germany and to assess the diagnostic value of each individual biomarker.

The research was conducted on a group of 220 subjects with previously established diagnoses. The group included 59 patients with confirmed Alzheimer's dementia, 14 with mixed dementia, 93 with other dementias or neurodegenerative diseases, and 54 patients without proven neurodegenerative disease, who represented the control group.

Statistical analysis of the results yielded cutoff values for Tau protein at <414 ng/L, for pTau protein at <71 ng/L, and for A β 42 at >734 ng/L. ROC curve analysis also showed that the biomarkers have a good sensitivity and specificity ratio.

Additionally, the results confirmed the diagnostic value of the three biomarkers in distinguishing Alzheimer's dementia from other forms of dementia, with pTau protein proving to be the most reliable biomarker.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Medicinska biokemija
Neurokemija
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

Određivanje graničnih vrijednosti biljega Alzheimerove demencije u likvoru

Monika Džimbeg
SAŽETAK

U ovom diplomskom radu analizirane su koncentracije Tau proteina, fosforiliranog Tau proteina i A β 42 u cerebrospinalnoj tekućini pacijenata s različitim oblicima demencija, kao i u kontrolnoj skupini. Određivanje ovih biomarkera ključno je za rano otkrivanje, praćenje i potvrdu Alzheimerove demencije. Cilj rada bio je odrediti granične vrijednosti za sva tri biljega za testove proizvođača Euroimmun iz Njemačke te ispitati dijagnostičku vrijednost svakog pojedinog biljega.

Istraživanje je provedeno na skupini od 220 ispitanika s ranije utvrđenim dijagnozama, a skupina je obuhvaćala 59 pacijenata s potvrđenom Alzheimerovom demencijom, 14 s miješanom demencijom, 93 s ostalim demencijama ili neurodegenerativnim bolestima te 54 pacijenata bez dokazane neurodegenerativne bolesti koji su predstavljali kontrolnu skupinu. Statističkom analizom rezultata dobivene su granične vrijednosti za Tau protein <414 ng/L, za pTau protein <71 ng/L i za A β 42 >734 ng/L. Analizom ROC krivulje pokazano je i da biljezi imaju dobar odnos osjetljivosti i specifičnosti.

Također, dobiveni rezultati potvrdili su dijagnostičku vrijednost navedena tri biljega za razlikovanje Alzheimerove demencije od ostalih oblika demencije pri čemu se kao najpouzdaniji biljeg pokazao pTau protein.

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

Rad sadrži: 40 stranica, 5 grafičkih prikaza, 19 tablica i 29 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Tau protein, fosforilirani Tau protein, beta-amiloid, granična vrijednost, likvor

Mentor: Doc.dr.sc. Željka Vogrinc, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: Doc.dr.sc. Željka Vogrinc, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.
Doc.dr.sc. Ana Kozmar, docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.
Doc.dr.sc. Marija Miloš, docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen:

Basic documentation card

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

Diploma thesis

Determination of cutoff of Alzheimer's dementia biomarkers in cerebrospinal fluid

Monika Džimbeg
SUMMARY

In this thesis, the concentrations of Tau protein, phosphorylated Tau protein, and A β 42 were analyzed from the cerebrospinal fluid of patients with various forms of dementia as well as in a control group. Determining these biomarkers is crucial for the early detection, monitoring, and confirmation of Alzheimer's dementia. The aim of the study was to establish cutoff values for all three biomarkers using tests from the Euroimmun manufacturer in Germany and to assess the diagnostic value of each individual biomarker.

The research was conducted on a group of 220 subjects with previously established diagnoses. The group included 59 patients with confirmed Alzheimer's dementia, 14 with mixed dementia, 93 with other dementias or neurodegenerative diseases, and 54 patients without proven neurodegenerative disease, who represented the control group.

Statistical analysis of the results yielded cutoff values for Tau protein at <414 ng/L, for pTau protein at <71 ng/L, and for A β 42 at >734 ng/L. ROC curve analysis also showed that the biomarkers have a good sensitivity and specificity ratio.

Additionally, the results confirmed the diagnostic value of the three biomarkers in distinguishing Alzheimer's dementia from other forms of dementia, with pTau protein proving to be the most reliable biomarker.

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

Thesis includes: 40 pages, 5 figures, 19 tables and 29 references. Original is in Croatian language

Keywords: Tau protein, phosphorylated Tau protein, beta-amyloid, cutoff, cerebrospinal fluid

Mentor: Željka Vogrinc, Ph.D. Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: Željka Vogrinc, Ph.D. Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Ana Kozmar, Ph.D. University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Marija Miloš, Ph.D. University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: