

# Ekspresija gena za moždani neurotrofni čimbenik i katehol-O-metil transferazu u leukocitima ispitanika oboljelih od demencije

---

**Bovan, Srećko**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2021**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:798789>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-28**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Srećko Bovan

**Ekspresija gena za moždani neurotrofni  
čimbenik i katehol-O-metiltransferazu u  
leukocitima ispitanika oboljelih od demencije**

Diplomski rad

Zagreb, 2021.

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Srećko Bovan

**Brain-derived neurotrophic factor and  
catechol-O-methyltransferase gene  
expression in leukocytes of subjects with  
dementia**

Master thesis

Zagreb, 2021.

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za molekularnu neuropsihijatriju, na Zavodu za molekularnu medicinu, Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu, pod vodstvom dr. sc. Matee Nikolac Perković, znanstvene suradnice IRB. Diplomski rad izrađen je 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 Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, radi stjecanja zvanja magistra eksperimentalne biologije.

## Zahvale

Zahvaljujem mentorici dr.sc. Matei Nikolac Perković na uloženom vremenu i trudu, na iskazanom strpljenju, angažiranosti i spremnosti na pomoć pri izradi rada.

Zahvaljujem dr.sc. Dubravki Švob Štrac na iskazanom povjerenju jer mi je omogućila dolazak u Laboratorij za molekularnu neuropsihijatriju.

Zahvaljujem dr.sc. Dubravki Hranilović na stručnom suvoditeljstvu ovog rada i na pruženim

Za kraj, posebno se zahvaljujem obitelji i prijateljima na pružanju podrške kroz cijelo školovanje.

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
1.1. Demencija	1
1.1.1. Klasifikacija demencija.....	2
1.1.2. Dijagnostika demencije.....	3
1.2. Alzheimerova bolest	4
1.2.1. Patologija Alzheimerove bolesti.....	6
1.2.2. Terapijski pristupi Alzheimerovoj bolesti.....	8
1.3. Blagi kognitivni poremećaj	8
1.4. Moždani neurotrofni čimbenik	9
1.4.1. Uloga moždanog neurotrofnog čimbenika u sinapsama.....	9
1.4.2. Uloga moždanog neurotrofnog čimbenika u učenju i pamćenju.....	11
1.4.3. Moždani neurotrofni čimbenik u Alzheimerovoj bolesti.....	11
1.5. Katehol-O-metiltransferaza	12
1.5.1. Katehol-O-metiltransferaza u Alzheimerovoj bolesti.....	14
<b>2. CILJ ISTRAŽIVANJA.....</b>	<b>16</b>
<b>3. MATERIJALI I METODE.....</b>	<b>17</b>
3.1. Ispitanici	17
3.2. Obrada uzoraka krvi	18
3.3. Izolacija ukupne RNA iz periferne krvi	19
3.4. Određivanje koncentracije izolirane RNA	20
3.5. Reverzna transkripcija izolirane RNA u komplementarnu DNA	21
3.6. Određivanje ekspresije gena za BDNF i COMT	22
3.6.1. Kvantifikacija genske ekspresije $\Delta\Delta C_t$ metodom.....	24
3.7. Statistička obrada podataka	25
<b>4. REZULTATI.....</b>	<b>26</b>
4.1. Demografski podaci	26
4.2. Ekspresija gena za moždani neurotrofni čimbenik	28
4.2.1. Ekspresija gena za moždani neurotrofni čimbenik kod ispitanika oboljelih od AB-a ili MCI-a	30
4.2.2. Ekspresija gena za moždani neurotrofni čimbenik i kognitivni simptomi demencije.....	31
4.3. Ekspresija gena za katehol-O-metiltransferazu	35
4.3.1. Ekspresija gena za katehol-O-metiltransferazu kod ispitanika oboljelih od AB-a ili MCI-a.....	37
4.3.2. Ekspresija gena za katehol-O-metiltransferazu i kognitivni simptomi demencije.....	38

5.	<b>RASPRAVA</b> .....	42
6.	<b>ZAKLJUČAK</b> .....	46
7.	<b>LITERATURA</b> .....	47
8.	<b>ŽIVOTOPIS</b> .....	52

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

---

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Diplomski rad

Ekspresija gena za moždani neurotrofni čimbenik i katehol-O-metiltransferazu u  
leukocitima ispitanika oboljelih od demencije

Srećko Bovan

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Demencija je sindrom uzrokovan oštećenjima u središnjem živčanom sustavu koja rezultiraju poremećajem kognitivnih sposobnosti pri očuvanoj svijesti. Smatra se da je dobar glavni čimbenik rizika za razvoj demencije, a s obzirom na starenje svjetske populacije predstavlja sve veći problem za društvo. Moždani neurotrofni čimbenik (BDNF) je član skupine neurotrofina koji u živčanom sustavu sudjeluje u neurogenezi i drugim neurotrofičnim i neuromodulatornim aktivnostima. Katehol-O-metiltransferaza (COMT) je enzim koji je ključan u metabolizmu kateholaminskih neurotransmitera. Cilj ovog rada je istražiti postoji li povezanost razine ekspresije gena *BDNF* i *COMT* u stanicama periferne krvi s razvojem demencije i provjeriti može li se razina ekspresije povezati i sa stupnjem kognitivnog oštećenja kod ispitanika s dijagnozom Alzheimerove bolesti ili blagog kognitivnog poremećaja. Rezultati su pokazali da je razina ekspresije gena *BDNF* značajno manja kod ispitanika s Alzheimerovom bolešću u odnosu na ispitanike s blagim kognitivnim poremećajem. Razina ekspresije gena *BDNF* povezana je i s razinom kognitivnog oštećenja, što potvrđuje značajna korelacija s rezultatima kognitivnih testova. U slučaju ekspresije gena *COMT* rezultati nisu potvrdili očekivanu povezanost s razvojem demencije, odnosno s oštećenjima kognitivnih sposobnosti.

(52 stranice, 11 slika, 8 tablica, 41 literaturni navod, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: Alzheimerova bolest, blagi kognitivni poremećaj, čimbenik rizika, izvršne funkcije

Voditelj: dr.sc. Matea Nikolac Perković, znanstveni suradnik

Suvoditelj: prof. dr. sc. Dubravka Hranilović

Ocjenitelji:

- prof.dr.sc.Dubravka Hranilović
- v.pred.dr.sc. Julija Erhardt
- doc.dr.sc. Zoran Marčić

Rad prihvaćen: 15.09.2021.



# BASIC DOCUMENTATION CARD

---

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Master Thesis

## Brain-derived neurotrophic factor and catechol-O-methyltransferase gene expression in leukocytes of subjects with dementia

Srećko Bovan

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Dementia is a syndrome caused by damage to the central nervous system that results in impaired cognitive abilities with preserved consciousness. Age is considered to be a major risk factor for the development of dementia, and due to the aging of the world's population it presents an increasing problem for society. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is a member of the neurotrophin family that participates in neurogenesis and other neurotrophic and neuromodulatory activities in the nervous system. Catechol-O-methyltransferase (COMT) is an enzyme that is crucial in the metabolism of catecholamines. The aim of this study was to investigate the association of *BDNF* and *COMT* expression levels in peripheral blood cells with the development of dementia and to examine whether the expression level of these two genes could be associated with the degree of cognitive impairment in subjects diagnosed with Alzheimer's disease or mild cognitive impairment. The results showed that the level of *BDNF* expression was significantly lower in subjects with Alzheimer's disease compared to subjects with mild cognitive impairment. *BDNF* gene expression levels were also associated with the level of cognitive impairment, which was confirmed by a significant correlation with the results of screening tests for cognitive impairment. In the case of *COMT* gene expression, the results did not confirm the expected association with the development of dementia, or with impairment of cognitive abilities.

(52 pages, 11 figures, 8 tables, 41 references, original in: croatian)

Thesis is deposited in Central Biological Library.

Keywords: Alzheimer's disease, Mild cognitive impairment, Risk factor, executive functions

Supervisor: Dr. Matea Nikolac Perković, Research assoc.

Co-supervisor: Dr. Dubravka Hranilović, Prof.

Reviewers:

- dr. Dubravka Hranilović, prof.
- dr. Julija Erhardt, sen.lec.
- dr. Zoran Marčić, doc.

Thesis accepted: 15.09.2021.

## Popis kratica

SŽS – središnji živčani sustav

MCI – blagi kognitivni poremećaj (eng. *Mild cognitive impairment*)

AB – Alzheimerova bolest (eng. *Alzheimer's disease*)

APP - prekursor proteina amiloid- $\beta$  (eng. *Amyloid-beta precursor protein*)

PSEN – presenilin

A $\beta$  – amiloid-beta

ApoE – apolipoprotein E

NMDA – N-metil-D-aspartat

A-MCI – amnestički blagi kognitivni poremećaj

NA-MCI – neamnestički blagi kognitivni poremećaj

BDNF – moždani neurotrofni čimbenik (eng. *Brain derived neurotrophic factor*)

Trk – kinaza povezana s tropomiozinom (eng. *Tropomyosin-related kinase*)

p75NTR – pan neutrofinski receptor

LTP – dugoročno potenciranje (eng. *Long-term potentiation*)

LTD – dugoročna depresija (eng. *Long-term depression*)

PKC – protein kinaza c

CaMKII – protein kinaza II ovisna o kalmodulinu

COMT – katehol-O-metil transferaza (eng. *Catechol-O-methyltransferase*)

MAO – monoamin oksidaza

DOPAC – 3,4-dihidroksifeniloctena kiselina

HVA – homovanilična kiselina

3-MT - 3-metoksitiramin

S-COMT – topivi COMT (eng. *Soluble catechol-O-methyltransferase*)

MB-COMT – COMT vezan za membranu (eng. *Membrane-bound catechol-O-methyltransferase*)

CDT – test crtanja sata (eng. *Clock drawing test*)

MMSE – test procjene mentalnog stanja (eng. *Mini mental state exam*)

PCR – lančana reakcija polimeraze (eng. *Polymerase chain reaction*)

cDNA – komplementarna DNA

GADPH – gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenaza

NFQ - utišivač fluorescencije (eng. *NonFluorescent Quencher*)

HDL – lipoproteini visoke gustoće (eng. *High-density lipoproteins*)

LDL – lipoproteini niske gustoće (eng. *Low-density lipoproteins*)

ITM – indeks tjelesne mase

# 1. UVOD

## 1.1. Demencija

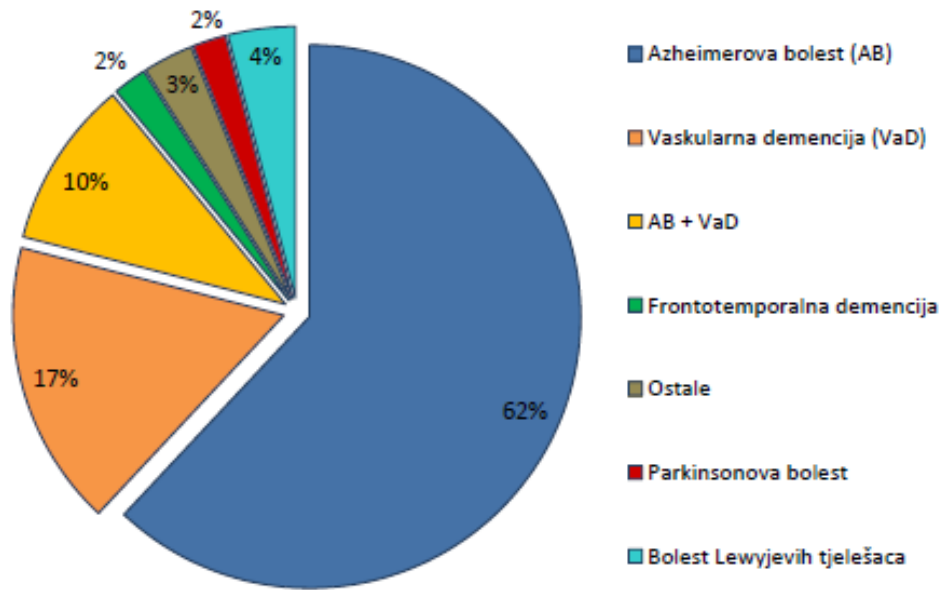
Demencija (lat. *de* – bez, *mens* – um) se definira kao sindrom uzrokovan neurodegeneracijom u središnjem živčanom sustavu (SŽS). Demenciju prvenstveno obilježavaju poremećaji u kognitivnim sposobnostima pri očuvanoj svijesti. Najviše su izraženi poremećaji pamćenja, učenja, orijentacije, apstraktnog razmišljanja i govora. Demencija je najčešće kronična i progresivna, a kako napreduje, dolazi do sve većih promjena u ponašanju kao i do fizičkih simptoma poput otežanog kretanja. Iako prvenstveno zahvaća populaciju stariju od 65 godina, sve češće se pojedini tipovi demencije dijagnosticiraju i kod pripadnika mlađe populacije. Učestalost demencije u europskim zemljama kreće se od 6 do 18% kod osoba starijih od 65 godina, a kod starijih od 85 godina oko 30%. (Prince i sur, 2015).

Modeli predviđaju da će se na svijetu do 2050. broj ljudi starijih od 60 godina povećati za 1,25 milijardu, čineći 22% populacije, a trenutno u svijetu od nekog oblika demencije boluje više od 50 milijuna ljudi. Dijagnosticira se otprilike 10 milijuna novih slučajeva godišnje. Unatoč tome što se zadnjih godina promiče svijest o demenciji i problemima koje predstavlja za pojedinca i društvo, velik broj slučajeva se službeno ne dijagnosticira, procjenjuje se čak do 58% (Savva i Arthur, 2015). Nedijagnosticirani slučajevi su uglavnom karakteristični za pripadnike starije populacije koji nemaju težu kliničku sliku i žive sami (Savva i Arthur, 2015). Od 2015. do 2021. je trošak skrbi o osobama koje boluju od demencije porastao sa 818 milijardi američkih dolara na više od 1 trilijun. Ovi podaci, zajedno s prognozama da će se do 2050. godine broj slučajeva demencije na svijetu udvostručiti, ukazuju na sve veći socio-ekonomski teret za skrbnike i za zdravstvo općenito (Prince i sur, 2015). Upravo iz ovog razloga vrlo je važno uspostaviti konkretne kriterije za donošenje što ranije i što pouzdanije dijagnoze bolesti te kriterije koji će omogućiti bolje razlikovanje između različitih tipova demencija kao i razlikovanje između simptoma normalnog starenja, simptoma blagog kognitivnog poremećaja (MCI, eng. *Mild cognitive impairment*) i simptoma demencije (Nikolac Perković, 2015).

### 1.1.1. Klasifikacija demencija

Demencije se mogu podijeliti na progresivne, kortikalne i subkortikalne ili na primarne i sekundarne. Razlika kortikalnih i subkortikalnih demencija je u kliničkoj slici oboljelih, naročito u početnim fazama bolesti. U početnim fazama kortikalnih demencija izraženije su promjene kognitivnih sposobnosti, kao gubitak kratkotrajnog pamćenja, i bihevioralne promjene. Subkortikalne demencije u početnim fazama karakteriziraju simptomi usporavanja razmišljanja i izostanak motivacije više nego pad u kognitivnim funkcijama. Najčešći tip kortikalne demencije je Alzheimerova bolest (AB), a najčešći tip subkortikalne demencije je Parkinsonova bolest (Cunningham i sur, 2015; Nikolac Perković, 2015).

U progresivne demencije spadaju AB, frontotemporalna demencija, vaskularna demencija i bolest Lewyjevih tjelešaca. Ove tipove demencije karakteriziraju simptomi koji postaju sve izraženiji s duljinom trajanja bolesti. Primarne i sekundarne demencije dijele se po uzroku. Primarne demencije uzrokovane su izravnim oštećenjem moždanog tkiva, a sekundarne demencije uzrokovane su drugim čimbenicima kao što su metabolički poremećaji (hipoglikemija, hipotiroidizam), infekcije (meningitis, encefalitis), uzimanje nekih lijekova, kronični alkoholizam, itd. (Cunningham i sur, 2015; Nikolac Perković, 2015). Sekundarne demencije ne karakteriziraju progresivnost i ireverzibilnost. U svjetskoj populaciji, najčešći tip demencije je AB, a potom ostale primarne demencije (Slika 1).



**Slika 1.** Zastupljenost tipova demencije u svjetskoj populaciji  
(preuzeto iz: Nikolac Perković, 2015)

### 1.1.2. Dijagnostika demencije

Za pregled i analizu moždanih aktivnosti i struktura koriste se:

- Računalna tomografija i magnetska rezonancija za detekciju atrofije moždanih struktura
- Pozitronska emisijska tomografija i jedno-fotonska emisijska računalna tomografija za praćenje moždanog krvotoka i za praćenje metaboličke aktivnosti pojedinih regija mozga

Za procjenu kognitivnog oštećenja koriste se različiti testovi koji uključuju procjenu kratkoročnog i dugoročnog pamćenja, pažnje, orijentacije, govora, itd. Osim navedenih metoda, provode se i psihometrijski testovi posebno dizajnirani za bolesnike s demencijom zato što uz demenciju često dolazi i do drugih psihijatrijskih simptoma kao što su depresija, anksioznost, euforija i apatija (Nicolac Perković, 2015).

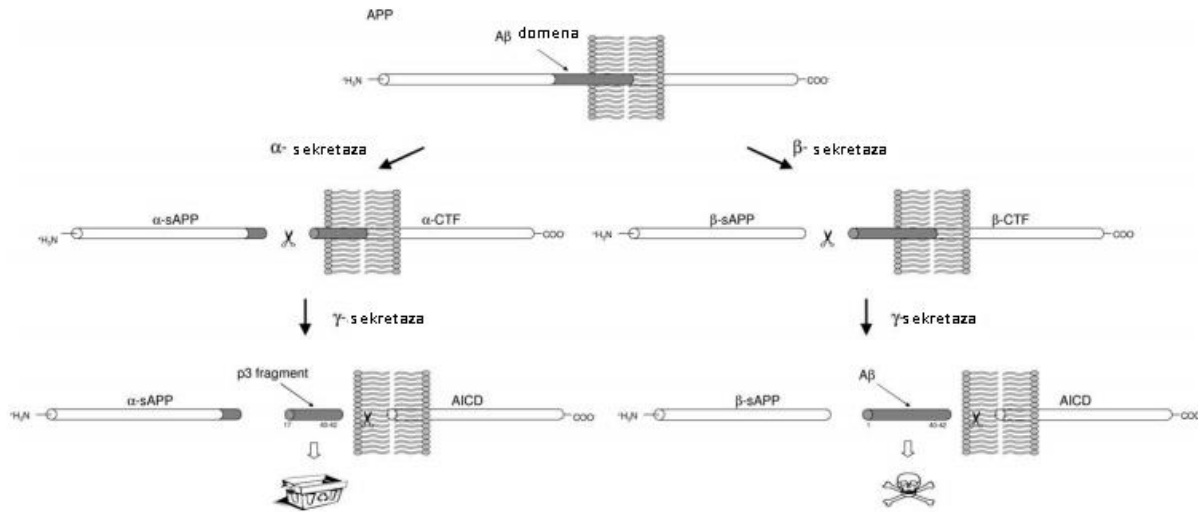
## 1.2. Alzheimerova bolest

Njemački psihijatar i neuropatolog Alois Alzheimer 1906. prvi je povezoao slučaj progresivnog opadanja intelektualnih sposobnosti s histološkim promjenama na mozgu koje su uključivale atrofiju moždane kore, pojavu senilnih plakova i neurofibriliranih snopića. Definirao je bolest kao presenilnu demenciju, a kasnije je dobila ime po njemu. Danas, više od 100 godina nakon otkrića AB-a, još uvijek se ne zna točan uzrok bolesti, ali uočeni su neki genetski i negenetski čimbenici rizika povezani s razvojem simptoma. Razlikuju se dva oblika AB-a, obiteljski i sporadični. Sporadični oblik AB-a se uglavnom pojavljuje nakon 65. godine života, a obiteljski se češće pojavljuje prije 65. godine života. Obiteljski oblik čini otprilike 5% svih slučajeva i ima izraženu genetičku podlogu (Minati i sur, 2009; DeTure i Dickson, 2019).

Mutacije u 3 gena povezane su s obiteljskim oblikom AB-a:

- Gen koji kodira za prekursor proteina amiloid- $\beta$  (APP)
- Geni koji kodiraju za presenilin (PSEN) 1 i PSEN 2

APP je transmembranski glikoprotein koji je od velikog interesa za istraživanje AB-a budući da njegovom proteolizom nastaju neurotoksični amiloid- $\beta$  ( $A\beta$ ) plakovi karakteristični za patologiju bolesti. Unatoč tome, ne zna se puno o njegovoj fiziološkoj funkciji. Uočeno je da se APP u većim količinama nalazi u stanicama pri neuronalnoj diferencijaciji ili pri ozljedi neurona što ukazuje na ulogu u formiranju i popravku sinapsi (Priller i sur, 2006). Mutacije značajne za AB nalaze se na mjestima cijepanja APP-a u metaboličkim putevima. APP se može cijepati na površini stanice pomoću  $\alpha$ -sekretaze i zatim  $\gamma$ -sekretaze, tim putem razgradnje ne nastaje protein  $A\beta$  (neamiloidogeni put). Drugi put razgradnje događa se unutar endosoma putem  $\beta$ -sekrataze i zatim  $\gamma$ -sekretaze, tim putem razgradnje nastaje peptid  $A\beta$  (amiloidogeni put) (Slika 2) (Querfurth i LaFerla, 2010).



**Slika 2.** Lijevo – neamiloidogeno cijepanje APP-a; Desno- amiloidogeno cijepanje APP-a (preuzeto i prilagođeno iz: Minati i sur, 2009)

Amiloidogenim putem može nastati više oblika Aβ, ali najčešće nastaje Aβ sastavljen od 40 (Aβ<sub>40</sub>), odnosno 42 aminokiseline (Aβ<sub>42</sub>). Aβ<sub>40</sub> je mnogo manje sklon oligomerizaciji od Aβ<sub>42</sub>. Oligomerizacijom Aβ<sub>42</sub> nastaju netopivi neurotoksični plakovi u izvanstaničnom prostoru kod oboljelih od AB-a.

Omjer nastalih oblika Aβ ovisi o više čimbenika, uključujući i mutacije u genima koji kodiraju za PSEN1 i PSEN2 (Minati i sur, 2009). PSEN1 i PSEN2 su integralni membranski proteini koji čine katalitičke podjedinice enzimskog kompleksa γ-sekretaze. Većina mutacija u genima *PSEN1* i *PSEN2* rezultira smanjenjem funkcije proteina i povećanjem razine Aβ<sub>42</sub> (Delabio i sur, 2014).

Osim ovih genetičkih čimbenika za razvoj AB-a, bitan je i gen za apolipoprotein E (ApoE). ApoE je glikoprotein koji je u živčanom sustavu prisutan prvenstveno u astrocitima, ali u manjim količinama prisutan je i u neuronima. ApoE ima funkciju liganda u endocitozi lipoproteina posredovanoj receptorima, ugrađuje se u lipoproteinske čestice i kontrolira njihov katabolizam. Gen za ApoE može sadržavati nekoliko polimorfizama jednog nukleotida (SNP, eng. *Single nucleotide polymorphism*). Tri najčešća SNP-a dovode do promjene u kodirajućoj sekvenci i rezultiraju u tri različite izoforme ApoE -a, a to su ApoE2, ApoE3 i ApoE4 (Kim i sur, 2009).

Iako se ova tri oblika ApoE razlikuju samo u jednoj ili dvije aminokiseline na pozicijama 112 ili 158, ove razlike značajno utječu na strukturu i funkciju ApoE-a. Alel E4 je povezan s obiteljskim



i sa sporadičnim oblikom AB. U usporedbi s osobama koje nemaju alel E4, rizik za oboljevanje od AB-a za one koje koji imaju jedan alel E4 povećava se dva do tri puta, a za osobe koje imaju dva alela E4 rizik za oboljevanje povećava se za 12 puta (Kim i sur, 2009). Također je povezan s ranijim početkom bolesti. Najvjerojatnija hipoteza je da fizička interakcija ApoE s A $\beta$  ima važnu ulogu u patogenezi AB-a, po njoj ta interakcija omogućava A $\beta$  konformacijske promjene koje dovode do nastanka plakova (Kim i sur, 2009; Namba i sur, 1991).

Kroz istraživanja uočeni su i razni negenetički čimbenici rizika za oboljevanje od AB-a. Ovi čimbenici rizika odnose se na visok krvni tlak, cerebrovaskularne i kardiovaskularne bolesti, hipokolesterolemiju, dijabetes tipa 2, prekomjernu tjelesnu težinu, pušenje, prekomjernu konzumaciju alkohola, nisku razinu fizičke aktivnosti. Od psihosocijalnih čimbenika koji utječu na razvoj demencije, ističe se važnost intelektualne i društvene aktivnosti. Pokazano je da osobe koje imaju višu razinu obrazovanja rjeđe oboljevaju od AB-a, kao i osobe koje se općenito više bave kognitivno stimulirajućim aktivnostima (učenje, čitanje, intelektualne igre). Također, osobe koje imaju izolirani stil života i manje društvenih kontakata, češće oboljevaju od demencije nego društveno aktivni pojedinci (Reitz i Mayeux, 2014).

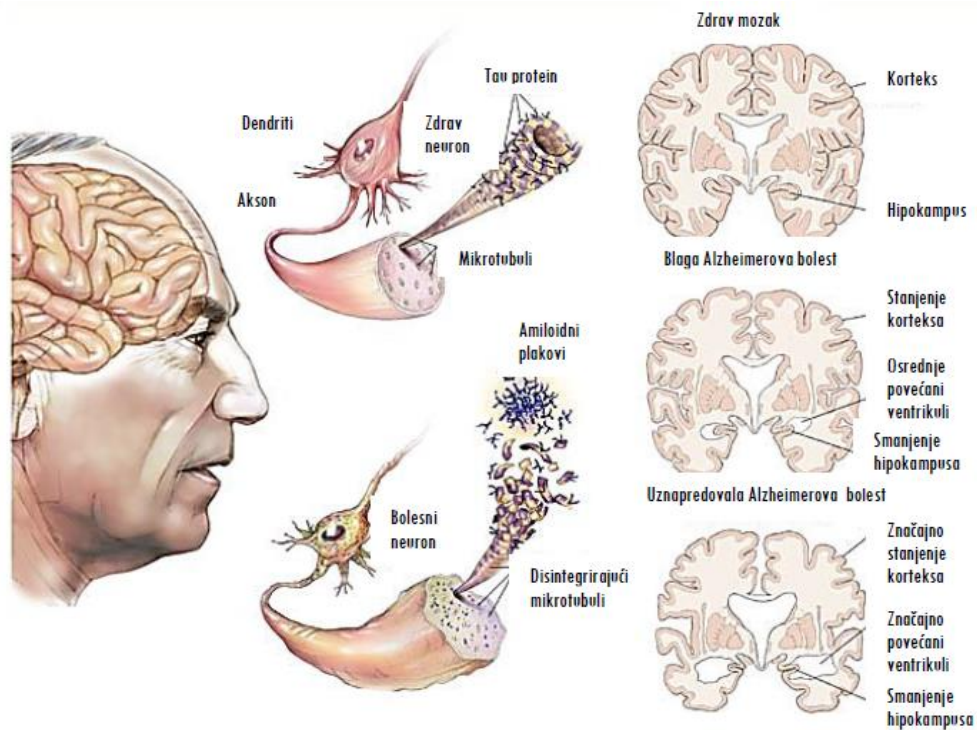
Iako pojedini mehanizmi zbog kojih ovi čimbenici povećavaju rizik od oboljevanja uglavnom nisu definirani, pokazalo se da neke preventivne mjere u ranijoj i srednjoj životnoj dobi mogu smanjiti rizik pojedinca da kasnije u životu razvije demenciju. To su zdrava prehrana bogata antioksidansima sa smanjenim unosom zasićenih masnih kiselina, adekvatna terapija povišenog krvnog tlaka, konzumacija crnog vina u umjerenim količinama, redovita fizička aktivnost i redovito upuštanje u kognitivno stimulirajuće aktivnosti (Reitz i Mayeux, 2014).

### 1.1.3. Patologija Alzheimerove bolesti

AB karakteriziraju makroskopske i mikroskopske patološke promjene na mozgu. Dolazi do pojave difuznih atrofičnih vijuga prvenstveno u frontalnom i temporalnom režnju, kao i do značajne atrofije hipokampusa koja se može proširiti na amigdalu. Smanjuju se masa i volumen moždane kore, a najčešće dolazi do povećanja temporalnog roga (Slika 3).

Problem je što ove promjene nisu isključivo karakteristične za AB već se pojavljuju i kod drugih stanja povezanih sa starenjem, čak i kod nedementnih osoba (DeTure i Dickson, 2019).

Postavljanje dijagnoze olakšava prisutnost mikroskopskih promjena, prvenstveno izvanstaničnih plakova A $\beta$  i unutarstaničnih neurofibrilarnih snopića sastavljenih od agregata hiperfosforiliranog proteina tau (Slika 3) (DeTure i Dickson, 2019; Querfurth i LaFerla; 2010).



**Slika 3.** Patološka obilježja AB-a

(preuzeto i prilagođeno sa: <https://www.semanticscholar.org/paper/Towards-an-applied-multicriteria-model-to-the-of-A-Tamanini-Castro/69cca5a280b28622f31a0b080b08f5d8545f06af>)

Eksperimentalni dokazi upućuju na to da akumulacija A $\beta$  prethodi i potiče agregaciju proteina tau, jer inducira ekspresiju kinaza koje mogu doprinijeti fosforilaciji proteina tau (Jakob-Roetne i Jacobsen, 2009). Protein tau je u normalnoj formi topiv i nefosforiliran, a ima ulogu u sastavljanju i održavanju stabilnosti mikrotubula u aksonima te u prijenosu vezikula. Međutim, u hiperfosforiliranoj formi je netopiv i ne može obavljati svoju funkciju već stvara helikalne filamentozne strukture koje su citotoksične.

Nakon što neuroni s ovim agregatima odumru, netopivi snopići ostaju u izvanstaničnom prostoru gdje ulaze u interakcije s astrocitima i stanicama mikroglije (Minati i sur, 2009).

Stanice mikroglije i astrociti početno razgrađuju proteinske agregate, ali dolazi do njihove kronične aktivacije. Kronično aktivirane mikroglija stanice ispuštaju kemokine i dolazi do kaskadne reakcije ispuštanja citokina što uzrokuje dodatno oštećenje tkiva (Querfurth i LaFerla, 2018).

#### 1.1.4. Terapijski pristupi Alzheimerovoj bolesti

Kompleksnost patogeneze AB-a i raznolikost patoloških obilježja kojima se manifestira čine stvaranje terapijskih pristupa ovoj bolesti vrlo teškim. Današnje opcije farmakoterapije omogućuju samo simptomatsko liječenje AB-a, koriste se inhibitori acetilkolinesteraze i antagonisti receptora za N-metil-D-aspartat (NMDA). Inhibiranjem acetilkolinesteraze povećava se koncentracija acetilkolina u mozgu što olakšava komunikaciju među neuronima (Minati i sur., 2009).

Ova skupina lijekova koristi se za ublažavanje kognitivnih simptoma kod blagog i umjerenog oblika AB-a, a antagonisti NMDA receptora koriste se kako bi se smanjio ekscitotoksični učinak prekomjerne količine glutamata koja se proizvodi u neuronima. Antagonist NMDA receptora memantin prvi je lijek odobren za primjenu kod težih oblika AB-a (Jakob-Roetne i Jacobsen, 2009). Trenutno su u kliničkoj fazi ispitivanja lijekovi koji bi izravno djelovali na patološku podlogu AB-a, a ne samo na ublažavanje simptoma. Temelje se na raznim imunoterapijskim pristupima kao što su inhibitori i modulatori sekretaza, inhibitori amiloidne agregacije te tvari koje bi pojačale uklanjanje amiloidnih plakova (Jakob-Roetne i Jacobsen, 2009).

### 1.3. Blagi kognitivni poremećaj

MCI predstavlja međustanje između normalnih promjena kognitivnih funkcija povezanih sa starenjem i onih promjena koje su karakteristične za oboljele od demencije. Pojedinci s dijagnozom MCI-a ne ispunjavaju kriterije za dijagnozu demencije. Poremećaj kognitivnih funkcija kod MCI-a je veći od očekivanog za dob pojedinca i odnosi se prvenstveno na zaboravljivost i probleme s koncentracijom.

Izvršne funkcije, jezične i vizualno-prostorne sposobnosti ostaju relativno nepromijenjene tako da pojedinci s MCI-a nemaju previše smetnji u svakodnevnom životu (Petersen, 2011).

Prisutan je kod 10 do 20% populacije starije od 65 godina, a kod otprilike pola onih s dijagnozom MCI-a kroz nekoliko godina razvije se demencija, najčešće AB (Petersen, 2011). MCI se dijeli na dva podtipa: amnestički oblik MCI-a (A-MCI) i neamnestički tip MCI-a (NA-MCI). A-MCI često prethodi razvoju AB-a i puno je češći od NA-MCI za kojeg se smatra da se razvija u ostale tipove demencija (Chertkow, 2002).

#### 1.4. Moždani neurotrofni čimbenik

Moždani neurotrofni čimbenik (BDNF) je protein iz skupine neurotrofina, važnih čimbenika za diferencijaciju i razvoj neurona tijekom embriogeneze i organogeneze. U odrasloj dobi se i dalje eksprimira u visokim količinama, regulira sinaptički prijenos i sintezu neurotransmitera te ima ulogu u neuroplastičnosti. Prisutan je u središnjem i perifernom živčanom sustavu gdje utječe na rast i morfologiju aksona i dendrita. BDNF djeluje na dopaminergički, kolinergički i serotoninergički neurotransmiterski sustav, a regulira i uzimanje hrane, osjet boli, raspoloženje, ponašanje te odgovor na stres. U mozgu je najaktivniji u područjima ključnima za učenje i pamćenje. BDNF i ostali neurotrofini potiču i kontroliraju neurogenezu, proces stvaranja novih neurona iz neuralnih progenitorskih stanica. BDNF i ostali neurotrofini mogu se vezati na dva tipa receptora: kinazu povezanu s tropomiozinom (Trk, eng. *Tropomyosin-related kinase*) i pan neurotrofinskim receptorom (p75NTR) (Miranda i sur., 2019; Binder i Scharfman, 2004).

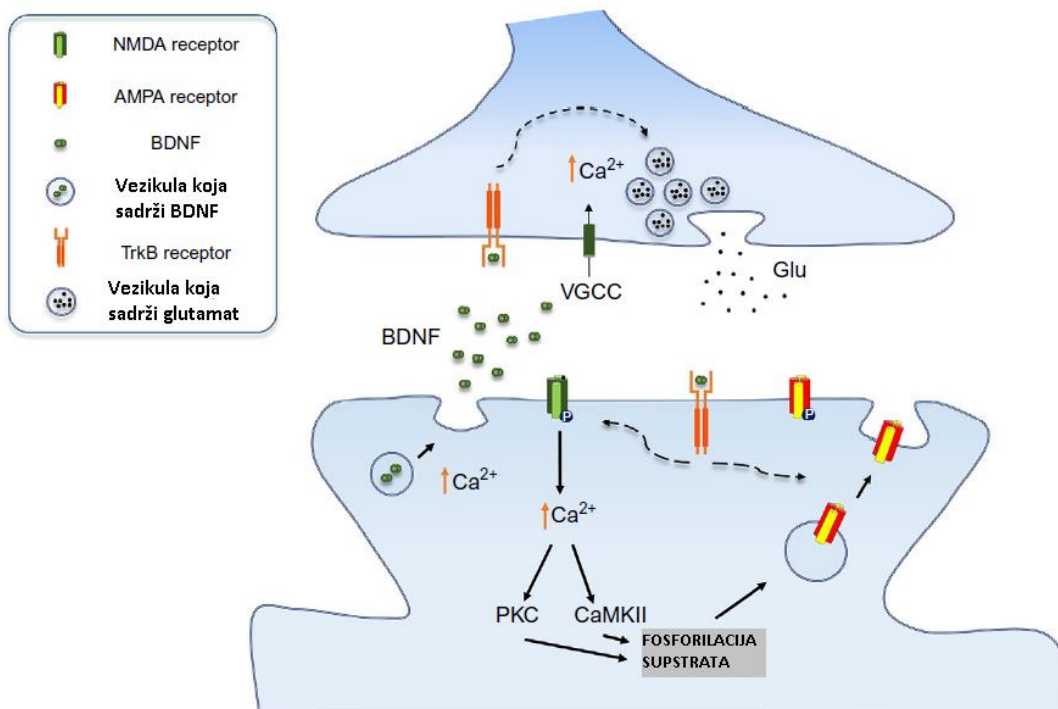
##### 1.1.5. Uloga moždanog neurotrofnog čimbenika u sinapsama

Osim trofičkih učinaka, neurotrofini imaju važnu ulogu u reguliranju sinaptičkog prijenosa te u sinaptičkoj plastičnosti. BDNF direktno utječe na dugoročno potenciranje (LTP, eng. *Long-term potentiation*), proces postepenog jačanja sinapsi uslijed dugoročnog prijenosa signala između neurona (Slika 4). BDNF se izlučuje u sinaptičku pukotinu kao odgovor na sinaptičku aktivnost i može aktivirati Trk receptore. Na presinaptičkim receptorima, BDNF povećava egzocitozu vezikula koje sadrže glutamat, a na postsinaptičkim receptorima inducira fosforilaciju NMDA receptora. Aktivacija tih receptora omogućava kalcijevim ionima da uđu u stanicu, a unutarstanično povećanje koncentracije kalcijevih iona aktivira više enzima (protein kinaza C, protein kinaza II ovisna o kalmodulinu) koji induciraju LTP.

Da bi došlo do dugoročne promjene u sinapsi, potrebne su promjene u ekspresijama gena i de novo sinteza proteina koja može trajati od nekoliko sati do nekoliko dana. Promjene se očituju kao povećan broj i volumen dendritičkih vrhova (Leal i sur., 2017).

Proces suprotan ovome zove se dugoročna depresija (LTD, eng. *Long-term depression*), to je mehanizam kojim se smanjuje snaga sinapse. LTD se događa kada se sinaptičke veze slabije koriste tijekom duljeg vremenskog perioda. Postoje indicacije da BDNF sudjeluje u regulaciji i ovog procesa (Miranda i sur., 2019).

U normalnom procesu starenja, stopa neurogeneze se smanjuje. Također dolazi do smanjenog induciranja LTP-a što isto može utjecati na pad u kognitivnim sposobnostima. Smanjena neurotrofična signalizacija je jedan od najkonzistentnijih deficita sinaptičke plastičnosti povezanih s procesom starenja (Miranda i sur., 2019).



**Slika 4.** Regulacija ekscitacijske sinapse u ranoj fazi LTP-a (Leal i sur., 2017)

Kratice: PKC- protein kinaza C; CaMKII- protein kinaza II ovisna o kalmodulinu

### 1.1.6. Uloga moždanog neurotrofnog čimbenika u učenju i pamćenju

Smatra se da stvaranje sjećanja uključuje kratkoročne promjene u električnim svojstvima sinapsi i dugoročne strukturne promjene. Kratkoročne promjene uključuju LTP i LTD, a dugoročne sinaptogenezu i rast živčanih vlakana. Budući da BDNF značajno utječe na ove procese njegova ekspresija je pojačana tijekom učenja i stvaranja memorije. Ulogu BDNF-a u učenju i pamćenju potvrđuju istraživanja na miševima i štakorima. Primjena anti-sense BDNF oligonukleotida kod miševa uzrokuje značajan pad razine mRNA koja kodira za BDNF u hipokampusu. Takvi miševi pokazuju probleme s prostornim učenjem iako su prethodno trenirani i imaju dobre prostorne vještine. Suprotno tome, razina BDNF-a se povećava tijekom procesa učenja i pamćenja (Mizuno i sur. 2000; Yamada i sur. 2002).

### 1.1.7. Moždani neurotrofni čimbenik u Alzheimerovoj bolesti

Smanjene razine BDNF-a se osim pri normalnom procesu starenja javljaju i kod nekih patoloških stanja kao što su Huntingtonova bolest, Parkinsonova bolest i AB. Kod AB-a, najveći deficit BDNF-a prisutan je u hipokampusu, parijetalnom, entorinalnom i frontalnom korteksu. Postoji korelacija između razine BDNF-a i težine simptoma AB-a, naročito epizodnog pamćenja. (Miranda i sur. 2019). Aspekti patogeneze AB-a u koje je uključen i BDNF su akumulacija A $\beta$ , sinaptička disfunkcija i upalni procesi. A $\beta$  i tau protein utječu na smanjivanje ekspresije BDNF-a što organizmu dodatno otežava borbu protiv neurotoksičnih učinaka plakova. Na životinjskim modelima zapažena je smanjena razina ekspresije BDNF-a u neuronima hipokampusu i korteksa, moždanim regijama u kojima najviše dolazi do nakupljanja A $\beta$ . Suprotno neuronima, ekspresija BDNF-a je pojačana u astrocitima i stanicama mikroglija izloženim A $\beta$  plakovima. Pojačana ekspresija BDNF-a u ovim stanicama najvjerojatnije se događa kako bi se održala adekvatna razina neurotrofičkih efekata u početnim fazama AB-a (Diniz i Teixeira, 2011).

BDNF direktno utječe na agregaciju A $\beta$ , stimulirajući neamiloidogeni put razgradnje APP-a. Pozitivni učinci toga su smanjena proizvodnja A $\beta_{42}$  i povećana sekrecija oblika APP-a koji ima neurotrofičku i neuroprotektivnu ulogu. Također, BDNF preko aktivacije receptora TrkB sudjeluje u defosforilaciji proteina tau što sprječava stvaranje agregata karakterističnih za AB (Elliot i sur, 2005).

Uloga BDNF-a u AB-u povezana je i s njegovom ulogom u regulaciji sinaptičkog prijenosa. Osim što promovira preživljavanje i diferencijaciju neurona, potiče i otpuštanje acetilkolina, neurotransmitera čija je razina smanjena kod osoba oboljelih od AB-a. Povišenje koncentracije BDNF-a uzrokovano farmakološki ili aerobnom fizičkom aktivnošću povezano je s boljim kognitivnim sposobnostima i smanjenim rizikom za razvoj AB-a (Miranda i sur 2019).

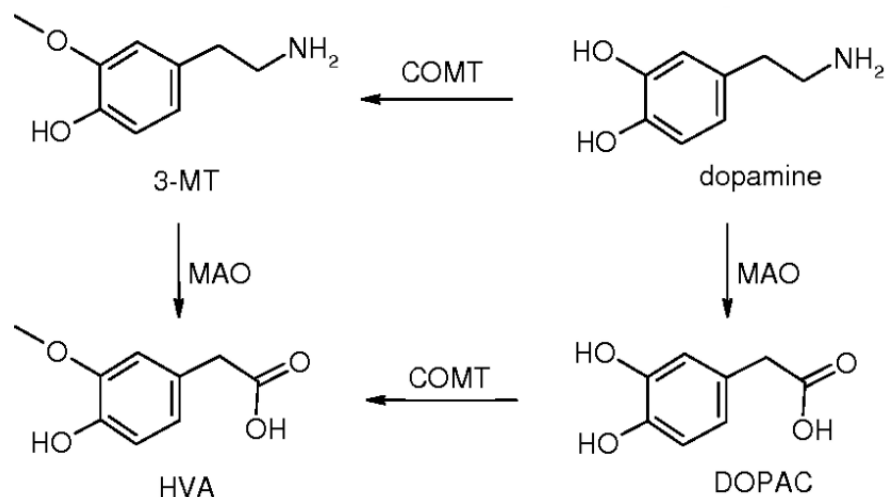
Genetska istraživanja pokazala su da prisutnost nekih polimorfizama na genu za BDNF povećava rizik za oboljevanje od AB-a, a najviše istraživani polimorfizam je Val66Met.

U nekim istraživanjima dobiveni rezultati ukazivali su na to da ipak ne postoji veza ovog polimorfizma i dijagnoze AB-a. Nakon što se u obradi rezultata u obzir uzeo i spol pacijenata, ispostavilo se da Val66Met značajno povećava rizik za razvoj AB-a kod žena, ali ne i kod muškaraca (Diniz i Teixeira, 2011).

Za povezanost drugih polimorfizama s razvojem AB-a također su dobiveni konfliktni rezultati, a to se može pripisati različitim efektima BDNF-a ovisno o stadiju bolesti te specifičnostima pacijenata uključenih u istraživanja (spol, rasa) (Diniz i Teixeira, 2011).

### **1.5. Katehol-O-metiltransferaza**

Katehol-O-metil transferaza (COMT) je enzim koji je uključen u metabolizam, tj. inaktivaciju kateholaminskih neurotransmitera i estrogena, ali prvenstveno sudjeluje u metabolizmu dopamina. Osim COMT-a, enzim koji sudjeluje u metabolizmu dopamina je monoaminoooksidaza (MAO). MAO razgrađuje dopamin u 3,4-dihidroksifeniloctenu kiselinu (DOPAC), koja se dalje pomoću COMT-a metabolizira do homovanilične kiseline (HVA). Dopamin se pomoću COMT-a preko O-metilacije izravno razgrađuje do 3-metoksitiramina (3-MT). Nakon toga, MAO može metabolizirati 3-MT u HVA (Slika 5) (Dickinson i Elvevåg, 2009).



**Slika 5.** Metabolizam dopamina

(preuzeto sa: <https://www.semanticscholar.org/paper/Long-Term-Monitoring-of-Brain-Dopamine-Metabolism-O'Neill/197a1b8e0710c800559098a932788e2521b192de>)

Osim u SŽS, COMT je prisutan i u perifernim tkivima (jetra, pluća, bubrezi i nadbubrežne žlijezde). Prisutan je u dvije izoforme, a to su kratka topiva izoforma (S-COMT) i duga izoforma koja je vezana za membranu (MB-COMT). MB-COMT je zastupljeniji u mozgu, a u ostalim tkivima dominira S-COMT (Nikolac Perković i sur., 2018).

Dopamin je povezan s brojnim neurološkim procesima u mozgu, kao što su kontrola pokreta, kognicija, učenje, pamćenje, zadovoljstvo i nagrada. COMT je posebno važan u sinapsama prefrontalnog korteksa gdje su transporter dopamina slabo ekspimirani pa ga to čini ključnim modulaturom aktivnosti dopaminergičnih neurona u tom području. Smanjene koncentracije dopamina u prefrontalnom korteksu povezane su sa smanjenim kognitivnim funkcijama i bihevioralnim promjenama kod normalnog procesa starenja, ali naglašene su i u nekim patološkim stanjima kao što su shizofrenija, Parkinsonova bolest, bipolarni poremećaj i depresija. Dopaminski sustav je u interakciji s kolinergičnim sustavom tako da poremećaji dopaminskog sustava uzrokuju promjene i u kolinergičnoj neurotransmisiji. Poremećaji ravnoteže ova dva sustava prisutni su u različitim oblicima demencije u varirajućim omjerima, a poznato je da disfunkcija kolinergičnih neurona više utječe na kognitivne simptome, dok disfunkcija dopaminergičnih neurona ima veći utjecaj na bihevioralne promjene (Nikolac Perković i sur., 2018; Serreti i Olgati, 2012).



Na genu za COMT kod ljudi često je prisutan visoko funkcionalni SNP rs4680 koji nastaje zamjenom valina metioninom na kodonu 108 kod izoforme S-COMT, odnosno na kodonu 158 kod izoforme MB-COMT (Val108/158Met). Ovaj SNP utječe na termostabilnost finalnog proteina COMT i može smanjiti enzimatsku aktivnost za više od 50%. Rezultat smanjene enzimске aktivnosti je značajno manja razina sinaptičkog dopamina nakon ispuštanja neurotransmitera, čime se smanjuje dopaminergična stimulacija postsinaptičkog neurona (Dickinson i Elvevåg, 2009).

Brojna istraživanja su provedena s ciljem da se ustanovi povezanost ovog polimorfizma s razvojem raznih patoloških stanja. U studijama se ovaj SNP pokazao kao odličan eksperimentalni alat za istraživanje umreženosti različitih mehanizama u SŽS, kao i za istraživanje genetskih utjecaja na kognitivne funkcije u kontekstu varijabilnih okolišnih, demografskih i razvojnih čimbenika. (Dickinson i Elvevåg, 2009).

#### 1.1.8. Katehol-O-metiltransferaza u Alzheimerovoj bolesti

Uloga COMT-a u metabolizmu kateholaminskih neurotransmitera i estrogena čini gen za ovaj peptid i njegove polimorfizme potencijalnim kandidatima za istraživanje patofiziologije AB-a. Postoji više indikacija da je funkcija dopaminskog sustava oslabljena kod osoba oboljelih od AB-a. Memantin, lijek koji se koristi kod oboljelih od težih oblika AB-a, djeluje kao agonist dopaminskih receptora D2 čime pojačava aktivnost dopamina u prefrontalnom korteksu i striatumu, budući da je vezanje za D2 receptore smanjeno kod osoba s AB-om do čak 30%. Neuroplastičnost povezana s LTD-om regulirana je mehanizmima ovisnima o L-3,4-dihidroksifenilalaninu, prekursoru dopamina. Kod zdravih pojedinaca, reverzibilnost LTD-a je lakše ostvariva nego kod oboljelih od AB-a (Serreti i Olgiati, 2012; Koch i sur, 2011).

Kod nositelja *COMT* rs4680 Met alela uočeni su slabiji rezultati na zadacima vezanim uz semantičko i epizodno pamćenje u odnosi na nositelje Val varijante gena, a ove funkcije značajno su oslabljene kod pacijenata s AB-om. Utjecaji varijanti COMT-a na izvršne funkcije kod shizofrenije i bipolarnog poremećaja replicirani su kod osoba srednje i starije životne dobi koje nemaju mentalne poremećaje, što dodatno upućuje na utjecaj dopaminske signalizacije na razinu kognitivnih posobnosti (Serreti i Olgiati, 2012).

Spol je bitan čimbenik za aktivnost COMT-a i za progresiju AB-a. Dvije trećine pacijenata s AB-om su žene i najčešće imaju veću razinu atrofije hipokampalnih neurona i dužu progresiju bolesti

u odnosu na muškarce (Lin i Doraiswamy, 2015). Estrogen i njegovi metaboliti imaju utjecaj na patologiju AB-a. 17- $\beta$ -estradiol inhibira fosforilaciju tau proteina, a estrogen pojačava unutarstanični prijenos APP-a čime sprječava nakupljanje  $\beta$ -amiloidnih snopića. Novija istraživanja pokazala su da pacijentice s AB-om imaju visoku razinu metabolizma estrogena i njegovih metabolita u organizmu te da primjena estrogena nije poboljšala kognitivne simptome niti usporila progresiju bolesti. Ova saznanja upućuju na to da estrogen može imati protektivni učinak u srednjoj životnoj dobi, ali da nakon menopauze ili nakon razvoja AB-a ovaj učinak nije značajan (Serreti i Olgiati, 2012; Nikolac Perković i sur, 2018).

Inhibitori COMT-a trenutno se koriste u liječenju Parkinsonove bolesti kako bi se povećala dostupnost L-3,4-dihidroksifenilalanina, ali postoje implikacije kako bi se ovi lijekovi mogli koristiti i za terapiju AB-a. Kod štakora su ovi spojevi inhibirali stvaranje snopića A $\beta$ , a kod ljudi su uočene pozitivne promjene u izvršnim funkcijama i radnoj memoriji, ali i negativne kod nositelja *COMT* Met/Met genotipa (Serreti i Olgiati, 2012).

Iako su inhibitori COMT-a druge generacije selektivniji i potentniji, prisutni su brojni problemi s farmakokinetikom, prolazanjem kroz krvno-moždanu barijeru, zbog kratkog poluvremena eliminacije ne mogu u potpunosti inhibirati COMT na periferiji i izrazito su toksični za jetru. Daljni razvoj inhibitora COMT-a mogao bi omogućiti njihovu primjenu u terapiji raznih patoloških stanja, uključujući i AB (Nicolac Perković i sur, 2018).

## 2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Zbog nedostatka pouzdanih podataka u literaturi, cilj ovog rada je istražiti postoji li povezanost razine ekspresije gena za BDNF i COMT u stanicama periferne krvi s razvojem demencije. Cilj je također istražiti može li se ekspresija ova dva navedena gena povezati i s razinom kognitivnog oštećenja kod osoba oboljelih od demencije, odnosno osoba s dijagnozom MCI-a.

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Ispitanici

U istraživanje je uključeno ukupno 160 ispitanika oba spola (40,0% muškaraca) koji su liječeni u Klinici za psihijatriju Vrapče, Zagreb. Ispitanici su podijeljeni prema dijagnozi na ispitanike s dijagnozom AB-a (N=74) te ispitanike s dijagnozom MCI-a (N=86).

Odgovarajuća dijagnoza ispitanika postavljena je od strane psihijataru pomoću strukturiranog kliničkog intervjua, a temeljem kriterija navedenih u Dijagnostičkom i statističkom priručniku za mentalne poremećaje, 5. izdanje (DSM-V, eng. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, fifth edition*) i kriterija Nacionalnog instituta za neurološke i komunikativne poremećaje i moždani udar koji je dio američkog Nacionalnog instituta za zdravlje (NINCDS-ADRDA, eng. *National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke and Alzheimer's Disease and Related Disorders Association*) (APA, 2013; Jack i sur., 2011). U sklopu neurokognitivnog ispitivanja bolesnika, za procjenu kognitivnih oštećenja u demenciji, korišten je test procjene mentalnog stanja (MMSE, eng. *Mini Mental State Examination*) i test crtanja sata (CDT, eng. *Clock Drawing Test*).

MMSE je psihometrijski test (Cockrell i Folstein, 1988; Folstein i sur., 1975) koji se najčešće u praksi koristi za procjenu kognitivnih sposobnosti u dijagnozi demencije. Navedeni test procjenjuje pažnju, budnost, govor, orijentaciju, memoriju, razumijevanje, imenovanje i ponavljanje, čitanje i pisanje, računanje te diskriminaciju lijevo-desno. MMSE se sastoji od različitih pitanja koja se boduju s nula bodova ili s jednim bodom, a maksimalni broj bodova koji osoba može ostvariti na testu MMSE je 30. Veći broj bodova na testu MMSE povezuje se s boljim kognitivnim sposobnostima.

Prema broju bodova na testu MMSE (Perneckzy i sur., 2006) osobe možemo podijeliti na:

- osobe s normalnim kognitivnim sposobnostima (broj bodova od 26 do 30);
- osobe s blagom demencijom (broj bodova od 21 do 25) – rana faza demencije;
- osobe s umjerenom demencijom (broj bodova od 11 do 20) – srednja faza demencije;
- osobe s teškim oblikom demencije (broj bodova  $\leq 10$ ) – kasna faza demencije.

Test CDT (Sunderland i sur., 1989) također se često koristi za procjenu ozbiljnosti simptoma demencije. Test se najčešće primjenjuje tako da ispitanici dobiju zadatak nacrtati kružnicu u koju moraju upisati brojeve i kazaljke sata koje pokazuju neko određeno vrijeme (najčešće je to 11 sati i 10 minuta). Tijekom bodovanja ocjenjuje se crtanje kruga (1 bod), brojeva (2 boda) i kazaljki s točnim vremenom (2 boda). Maksimalni mogući broj bodova koje osoba može ostvariti na testu CDT je 5, ukoliko su nacrtali sat, kazaljke i točno vrijeme. Broj bodova CDT=5 upućuje na to da kod osobe nisu oštećene kognitivne sposobnosti. Ukoliko je na testu ostvaren manji broj bodova, osoba se upućuje na daljnje ispitivanje.

Iz navedenog istraživanja isključeni su svi ispitanici kod kojih je dijagnosticirana vaskularna ili miješana demencija, tumori ili upalne bolesti središnjeg živčanog sustava, traume mozga, sistemske metaboličke bolesti te druga neurološka oboljenja (npr. Hungtintonova bolest, Pickova demencija).

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

### **3.2. Obrada uzoraka krvi**

Ispitanicima je izvađena krv (8 mL) u staklene epruvete za hematološke analize (BD Vacutainer®) s 2 mL konzervansa, tj. antikoagulansa koji sadrži limunsku kiselinu, natrij citrat i dekstrozu (ACD, eng. *Acid Citrat Dextrose*) tijekom uobičajenih laboratorijskih pretraga. Uzorci krvi svih ispitanika prikupljeni su dok su osobe bile natašte, a uzorci krvi su dostavljeni i obrađeni unutar 24 sata na Institutu „Ruđer Bošković“ u Laboratoriju za molekularnu neuropsihijatriju. Serijom centrifugiranja iz pune krvi prvo je izdvojena plazma (3 min pri 1100 x g), a zatim iz plazme trombociti (15 min pri 5087 x g). Preostali dio krvi s leukocitima korišten je za izolaciju ukupne RNA.

### 3.3. Izolacija ukupne RNA iz periferne krvi

Za izolaciju RNA iz uzoraka krvi ispitanika koristio sam komercijalni komplet PureLink RNA Mini Kit (Life Technologies,SAD) prema uputama proizvođača.

Kemikalije:

- 2-merkaptetanol (Sigma-Aldrich, SAD)
- 100% etanol (Gram-Mol, RH)

PureLink RNA Mini Kit (Life Technologies,SAD):

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

Prije početka postupka, bilo je potrebno odmrznuti pohranjene uzorke krvi na sobnoj temperaturi i promiješati ih na valjkastoj miješalici. Također je bilo potrebno napraviti konačni pufer za lizu krvnih stanica i pufer za ispiranje II. U slučaju pufera za lizu stanica, na svakih 0.2 mL pufera za lizu dodao sam 2  $\mu$ L 2-merkaptetanola. Kod pripreme pufera za ispiranje II, dodao sam 60 mL 96-100% etanola izravno u pufer za ispiranje II koji je sastavni dio komercijalnog kompleta PureLink RNA Mini Kit.

U sterilnu mikroeprijetu volumena 1.5 mL dodao sam 0.2 mL uzorka krvi i 0.2 mL prethodno pripremljenog pufera za lizu stanica. Mikroeprijetu sam stavio u tresilicu i temeljito protresao kako bi došlo do lize stanica. Lizat sam nakon toga centrifugirao dvije minute pri 12 000 x g pri sobnoj temperaturi. Supernatant sam potom prebacio u novu sterilnu mikroeprijetu istog tipa i u njega dodao 200  $\mu$ L 100% etanola. Talog sam raspršio pipetom uzimajući i ispuštajući uzorak više puta za redom. Promiješani uzorak prebacio sam u kolonu za centrifugiranje s mikroeprijetom za sakupljanje. Kolonu za centrifugiranje s mikroeprijetom za sakupljanje centrifugirao sam 15 sekundi pri 12 000 x g pri sobnoj temperaturi i po završetku bacio sve što je prošlo u mikroeprijetu za skupljanje.

Nakon toga, bilo je potrebno isprati kolonu za centrifugiranje na kojoj je ostala vezana RNA.

Dodao sam 700  $\mu$ L pufera za ispiranje I na kolonu za centrifugiranje i centrifugirao 15 sekundi pri 12 000 x g pri sobnoj temperaturi, potom bacio sadržaj skupljen u mikroeprevetu i stavio kolonu za centrifugiranje u novu sterilnu mikroeprevetu za sakupljanje. Na kolonu za centrifugiranje sam potom stavio 500  $\mu$ L prethodno pripremljenog pufera za ispiranje II s etanolom. Kolonu za centrifugiranje sam nakon ispiranja centrifugirao 15 sekundi na 12 000 x g pri sobnoj temperaturi. Stavljanje 500  $\mu$ L pufera za ispiranje II s etanolom i centrifugiranje pri istim uvjetima ponovio sam još jednom. U ovim koracima nije bilo potrebno mijenjati mikroeprevetu za sakupljanje.

Zatim sam osušio membranu kolonu za centrifugiranje centrifugirajući je jednu minutu pri 12 000 x g pri sobnoj temperaturi. U zadnjem koraku odbacio sam mikroeprevetu za sakupljanje i kolonu za centrifugiranje stavio u mikroeprevetu za eluciju RNA. Na sredinu kolonu za centrifugiranje dodao sam 60  $\mu$ L vode bez RNaza i ostavio je inkubirati jednu minutu na sobnoj temperaturi. Nakon još jednog centrifugiranja od jedne minute pri 12 000 x g pri sobnoj temperaturi, pročišćena RNA eluirala se u mikroeprevetu. Uzorak pročišćene RNA čuvao se pri temperaturi od -80 °C do daljnje obrade.

### 3.4. Određivanje koncentracije izolirane RNA

Za određivanje koncentracije pročišćene RNA u uzorcima koristio sam nanofotometar C40 (Implen, SAD) koji mjeri apsorbanciju na valnoj duljini od 260 nm (A). Koncentraciju RNA mjerio sam u ukupnom volumenu od 1-2  $\mu$ L. Koncentracija dobivene RNA računao sam prema slijedećoj formuli:

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

Za određivanje čistoće RNA, tj. za određivanje stupnja zagađenja proteinima mjerio sam i apsorbanciju pri 280 nm te računao omjer  $A_{260}/A_{280}$ .

Omjer veći od 1,8 upućuje na to da je izolirana RNA čista. Omjer apsorbancije pri 230 nm i 260 nm ( $A_{260}/A_{230}$ ) koristi se za detekciju onečišćenja solima, ugljikohidratima, peptidima i fenolom.

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

Kako bi se mogla provesti lančana reakcija polimeraze (PCR, eng. *Polymerase chain reaction*) za određivanje ekspresije gena, bilo je potrebno napraviti reverznu transkripciju izolirane RNA u komplementarnu DNA (cDNA) koja se može koristiti kao kalup. Za reverznu transkripciju koristio sam komercijalno dostupan komplet RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, SAD).

Sav sadržaj kompleta čuvao se zamrznut do upotrebe.

Kemikalije iz kompleta:

- 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, sve kemikalije iz kompleta kratko sam centrifugirao i nakon toga držao na ledu.

Za 0.1 ng - 5  $\mu$ g početnog RNA kalupa, dodao sam 1  $\mu$ l početnica (nasumičnih heksamera) i vode bez RNaza toliko da ukupni volumen bude 12  $\mu$ L. Mi smo u svaku reakciju dodali po 30 ng ukupne RNA. Reakcijska smjesa je inkubirana 5 minuta pri temperaturi od 65 °C zbog mogućnosti da je RNA kalup bogat GC dinukleotidima ili sadrži sekundarne strukture. Za inkubaciju sam koristio uređaj 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems, SAD). Nakon inkubacije, uzorke sam ohladio na ledu, kratko centrifugirao i potom vratio na led. U uzorke sam dodao 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 mješavine za svaki uzorak bude 20  $\mu$ L. Uzorke sam kratko centrifugirao te inkubirao prvo 5 min pri temperaturi od 25 °C, a zatim 60 minuta pri temperaturi od 42 °C. Zaustavljanje reakcije nakon toga napravio sam inkubacijom od 5 minuta pri temperaturi od 70 °C.

Produkt reakcije je prvi lanac cDNA, nije potrebno raditi dvolančanu DNA jer se pri mjerenju ekspresije gena cDNA umnaža PCR-om uz pomoć početnica. Uzorci se mogu odmah koristiti ili



pohraniti pri temperaturi od -20 °C do tjedan dana, a za dužu pohranu potrebno ih je čuvati pri temperaturi od -70 °C.

### 3.6. Određivanje ekspresije gena za BDNF i COMT

Ekspresiju gena za BDNF i COMT odredio sam metodom PCR-a u stvarnom vremenu pomoću uređaja ABI Prism 7300 Sequence Detection System (Applied Biosystems, SAD) koristeći komercijalno dostupni komplet kemikalija TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems, SAD). Kao internu kontrolu koristio sam gen za gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenazu (GADPH) (Applied Biosystems, SAD) budući da ima stalnu ekspresiju u organizmu. U Tablici 1 prikazani su kompleti kemikalija TaqMan Gene Expression Assays koji su korišteni za ekspresiju gena *BDNF*, *COMT* i *GAPDH*.

**Tablica 1.** Kompleti kemikalija TaqMan Gene Expression Assays koji su korišteni za ekspresiju gena *BDNF*, *COMT* i *GAPDH*.

TaqMan Gene Expression Assay ID	Naziv gena	Pristupni broj u banci gena	Veličina PCR odsječka
Hs02718934_s1	<i>BDNF</i>	NM_001143805.1	71
Hs00241349_m1	<i>COMT</i>	NM_000754.3	118
Hs00266705_g1	<i>GAPDH</i>	NM_001289745.1	74

Korištenjem ove metode dolazi do specifične hibridizacije između ciljane cDNA i probe obilježene fluorescentnom bojom kako bi se stvorio fluorescentni signal. Svaka proba u reakcijskoj smjesi je na 5' kraju obilježena jednom fluorescentnom bojom (FAM) i specifično se veže za slijed unutar ciljane cDNA. Na 3' kraju svake probe vezan je utišivač fluorescencije (NFQ, eng. *NonFluorescent Quencher*). Kada je proba vezana za komplementarni slijed na lancu DNA, utišivač i boja se nalaze na takvoj udaljenosti koja omogućuje utišivaču da spriječi fluorescenciju boje. Prilikom produljivanja početnica termostabilna DNA polimeraza cijepa vezane probe, boja više nije pod utjecajem utišivača te počinje fluorescirati što se bilježi uređajem kao signal.

Razina fluorescencije prati se računalnim programom SDS v1.4.1 (Applied Biosystems, SAD) koji daje prikaz razine fluorescencije u svakom pojedinom uzorku.

Kemikalije:

- Voda bez RNaza
- Taqman Gene Expression MasterMix – 2x koncentriran
- Početnica i sonda obilježena fluorescentnom bojom 6-FAM za gen *GADPH* - interna kontrola (Tablica 1) – 20x koncentrirana
- Početnica i sonda obilježena fluorescentnom bojom 6-FAM za gen *BDNF* (Tablica 1) – 20x koncentrirama
- Početnica i sonda obilježena fluorescentnom bojom 6-FAM za gen *COMT* (Tablica 1) – 20x koncentrirana

Prije započinjanja postupka, uzorke cDNA i kompletne TaqMan Gene Expression Assays bilo je potrebno odmrznuti. Nakon odmrzavanja, uzorke sam kratko vorteksirao i centrifugirao. Matičnu otopinu za određivanje ekspresije gena Taqman Gene Expression MasterMix također sam trebao promiješati prije upotrebe. Za PCR reakciju u uređaju ABI Prism 7300 koristio sam MicroAmp® reakcijsku pločicu s 96 jažica. Po jednoj pločici mjerio sam gensku ekspresiju gena *BDNF*, *COMT* i *GADPH* iz 8 uzoraka cDNA u kvadruplikatima za svaki gen.

U svakoj jažici konačni volumen reakcijske mješavine morao je biti 20 µL, a ukupna količina cDNA u svakom uzorku morala je biti u rasponu od 1-100 ng.

Nakon što sam pripremio reakcijsku mješavinu u svim jažicama (Tablica 2), na pločicu sam stavio MicroAmp® optički adhezivni film. Bilo je potrebno obratiti pažnju da nema prodora zraka u pločicu kako se isparavanjem ne bi gubio volumen tekućine u jažicama. Također je bilo bitno da film bude bez nečistoća kako bi došlo do ispravnog očitavanja rezultata. Uvjeti reakcije za određivanje ekspresije gena metodom PCR-a u stvarnom vremenu navedeni su u Tablici 3.

**Tablica 2.** Reakcijska mješavina za PCR u stvarnom vremenu

Sastojci PCR smjese	Početna koncentracija	Konačna koncentracija	Volumen / µL
Uzorak cDNA	1,50 ng/µl	0,25 ng/µl (oko 5 ng po reakciji)	3,3
TaqMan Gene Expression Master Mix	2×	1×	10
Početnice i sonda istraživanog gena (BDNF/COMT/GAPDH)	20×	1×	1
Voda bez RNaza			do 20 µL
Ukupan reakcijski volumen			20

**Tablica 3.** Uvjeti reakcije određivanje ekspresije gena metodom PCR-a u stvarnom vremenu

Faze reakcije	Temperatura	Vrijeme
<b>Hold</b>	1 ciklus	
	50 °C	2 min
<b>Početna denaturacija</b>	1 ciklus	
	95 °C	10 min
<b>PCR</b>	50 ciklusa	
	95 °C	15 s
	60 °C	1 min

### 3.6.1. Kvantifikacija genske ekspresije $\Delta\Delta Ct$ metodom

Za određivanje relativne ekspresije gena od interesa koristio sam komparativnu Ct metodu,  $\Delta\Delta Ct$ , (Livak i Schmittgen, 2001), gdje Ct označava ciklus pri kojem je količina umnoženog produkta dosegla prag detekcije fluorescentnog signala. Razliku u Ct vrijednosti za svaki ciljani gen (*BDNF* i *COMT*), normalizirao sam za ekspresiju gena *GAPDH* te izrazio kao  $\Delta Ct$  vrijednost. Razliku u ekspresiji ciljnih gena kod ispitanika s AB-om izrazio sam kao relativnu ekspresiju u odnosu na ekspresiju kod ispitanika s dijagnozom MCI- a (kontrolni uzorak). Dobivene  $\Delta Ct$  vrijednosti za uzorke ispitanika s AB-om i ispitanike s MCI-em sam sve usporedio s  $\Delta Ct$  vrijednosti kalibratora, odnosno s prosiječnom  $\Delta Ct$  vrijednosti MCI uzoraka koji su uzeti kao kalibrator. Relativnu razliku u ekspresiji gena odredio sam koristeći formulu:

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

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

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

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

### 3.7. Statistička obrada podataka

Za statističku obradu podataka koristio sam program GraphPad Prism, verziju 4.00 (GraphPad Software, San Diego, California, SAD), a za grafički prikaz rezultata program Microsoft Excel 2019. Razinu značajnosti  $\alpha$  postavio sam na 0,05, a svi korišteni testovi bili su dvosmjerni. Kolmogorov-Smirnov test koristio sam za utvrđivanje normalnosti razdiobe pojedinih parametara. Podatke koji su odstupali od normalne razdiobe, kao što su klinički i demografski parametri, te relativna razina ekspresije gena *BDNF* i *COMT*, prikazao sam kao medijan, interkvartilni raspon između 25. i 75. percentile te raspon (minimum i maksimum).

Za usporedbu vrijednosti različitih istraživanih parametara koristio sam neparametrijske testove jer podaci nisu imali normalnu razdiobu. Kod usporedbe dvije grupe podataka koristio sam Mann-Whitney U test, a kod usporedbe tri ili više skupina podataka neparametrijsku Kruskal-Wallisov test ANOVA rangova. U slučaju Kruskal-Wallis testa, kada je utvrđena značajna razlika između pojedinih skupina, dodatno sam napravio odgovarajuću post-hoc analizu kako bi se međusobno usporedile pojedine grupe ispitanika (Conover, 1999).

Povezanost broja bodova na testu MMSE te povezanost pojedinih demografskih i kliničkih parametara s relativnom ekspresijom gena *BDNF* i *COMT* odredio sam izračunavanjem Spearmanovog koeficijenta korelacije ( $r_s$ ) zbog odstupanja od normalne razdiobe podataka.

## 4. REZULTATI

### 4.1. Demografski podaci

U istraživanje je uključeno ukupno 160 ispitanika oba spola (40,0% muškaraca) koji su podijeljeni prema dijagnozi na ispitanike s dijagnozom AB-a (N=74) te ispitanike s dijagnozom MCI-a (N=86). Istraživane skupine nisu se značajno razlikovale u raspodjeli spolova ( $\chi^2=0,71$ ;  $df=1$ ;  $p=0,400$ ).

Tablica 4 prikazuje demografske podatke ispitanika koji su podijeljeni prema dijagnozi. Normalna distribucija svih demografskih varijabli testirana je Kolmogorov-Smirnovim testom. S obzirom na odstupanja od normalne distribucije u slučaju svih ispitivanih demografskih i kliničkih parametara, za analizu je korišten neparametrijski Mann-Whitney U test.

Usporedba istraživanih skupina pokazala je da postoji statistički značajna razlika u dobi ( $p\leq 0,001$ ) ispitanika (Tablica 4). Glavna razlika u dobi između istraživanih skupina proizlazi iz činjenice da je skupina ispitanika s AB-om starija od skupine ispitanika s dijagnozom MCI-a (Tablica 4). Usporedba ispitanika s obzirom na broj bodova na pojedinim psihometrijskim testovima, koji se koriste za procjenu kognitivnih sposobnosti u dijagnozi demencije, potvrđuje da se istraživane skupine značajno razlikuju u broju bodova na testu MMSE ( $p\leq 0,001$ ) i CDT ( $p\leq 0,001$ ) zbog značajno manjeg broja bodova na oba psihometrijska testa kod ispitanika s dijagnozom AB-a (Tablica 4). Između ispitanika s dijagnozom AB-a i ispitanika s MCI-em nije bilo značajne razlike u ostalim kliničkim i demografskim podacima (Tablica 4).

**Tablica 4.** Demografski i klinički podaci ispitanika podijeljenih prema dijagnozi u ispitanike s MCI-em i u ispitanike s AB-om. Svi podaci su prikazani kao medijan (raspon).

Demografske i kliničke karakteristike ispitanika	Ispitanici		Mann-Whitney U test	
	N (% muškaraca)		U	p
	Blagi kognitivni poremećaj	Alzheimerova bolest		
	86 (43,0)	74 (36,5)		
<b>Dob (godine)</b>	71,0 (57,0-87,0)	79,0 (63,0-89,0)	5111,5	<b>&lt;0,001</b>
<b>ITM (kg/m<sup>2</sup>)</b>	22,0 (18,4-32,4)	22,9 (18,5-31,9)	3355,5	0,550
<b>Obujam struka (cm)</b>	86,0 (71,0-101,0)	86,0 (72,0-99,0)	3173,0	0,975
<b>Ukupni kolesterol (mmol/l)</b>	5,7 (3,2-8,8)	5,6 (3,2-8,8)	2936,5	0,400
<b>HDL-kolesterol (mmol/l)</b>	1,3 (0,7-3,0)	1,3 (0,7-3,0)	3012,5	0,560
<b>LDL-kolesterol (mmol/l)</b>	3,5 (0,8-5,6)	3,2 (0,8-5,8)	3048,5	0,647
<b>Trigliceridi</b>	1,8 (0,7-6,7)	1,7 (0,7-6,7)	3048,0	0,645
<b>Glukoza natašte (mmol/l)</b>	5,5 (4,5-11,8)	5,6 (4,7-11,8)	3415,0	0,423
<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)	187,0	<b>&lt;0,001</b>

Lipoproteini velike gustoće (**HDL**, eng. *high-density lipoproteins*); **ITM**, indeks tjelesne mase; LDL, lipoproteini male gustoće (**LDL**, eng. *low-density lipoproteins*); N, broj ispitanika.

## 4.2. Ekspresija gena za moždani neurotrofni čimbenik

Metodom kvantitativnog PCR-a, odnosno PCR-a u stvarnom vremenu, određena je razlika u ekspresiji gena BDNF kod ispitanika s AB-om i onih s dijagnozom MCI-a. 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.

Normalna razdioba vrijednosti relativne ekspresije gena BDNF u uzorcima testirana je Kolmogorov-Smirnovim testom. S obzirom na odstupanje od normalne razdiobe podataka, u svim daljnjim analizama korišteni su neparametrijski testovi za statističku obradu podataka.

S obzirom na potencijalni utjecaj pojedinih demografskih i kliničkih parametara na ekspresiju gena BDNF, analizirana je korelacija (Spearmanov koeficijent korelacije,  $r_s$ ) svih demografskih i kliničkih parametara s relativnom ekspresijom gena BDNF u obje istraživane skupine ispitanika (Tablica 5). Iz prikazanih rezultata (Tablica 5) vidljivo je da nema značajne povezanosti pojedinih demografskih i kliničkih parametara s razinom relativne ekspresije gena BDNF kod ispitanika s AB-om te ispitanika s dijagnozom MCI-a. Jedino u slučaju HDL-a pronađena je značajna korelacija ( $p=0,018$ ) s razinom ekspresije gena BDNF, ali samo kod ispitanika s MCI-em (Tablica 1).

Mogući utjecaj spola na relativnu ekspresiju gena BDNF analiziran je u obje skupine ispitanika pomoću Mann-Whitney U testa. U slučaju ispitanika s dijagnozom AB-a nije bilo značajne razlike u relativnoj ekspresiji gena BDNF između muškaraca i žena ( $U=582,0$ ;  $p=0,555$ ), a isti trend je uočen i kod ispitanika s MCI-em ( $U=900,5$ ;  $p=0,958$ ). Zbog svega navedenog nije bilo potrebe 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 mjerene natašte.

**Tablica 5.** Korelacija relativne ekspresije gena BDNF s demografskim i kliničkim parametrima u ispitanika podijeljenih prema dijagnozi na ispitanike s MCI-em i ispitanike s AB-om.

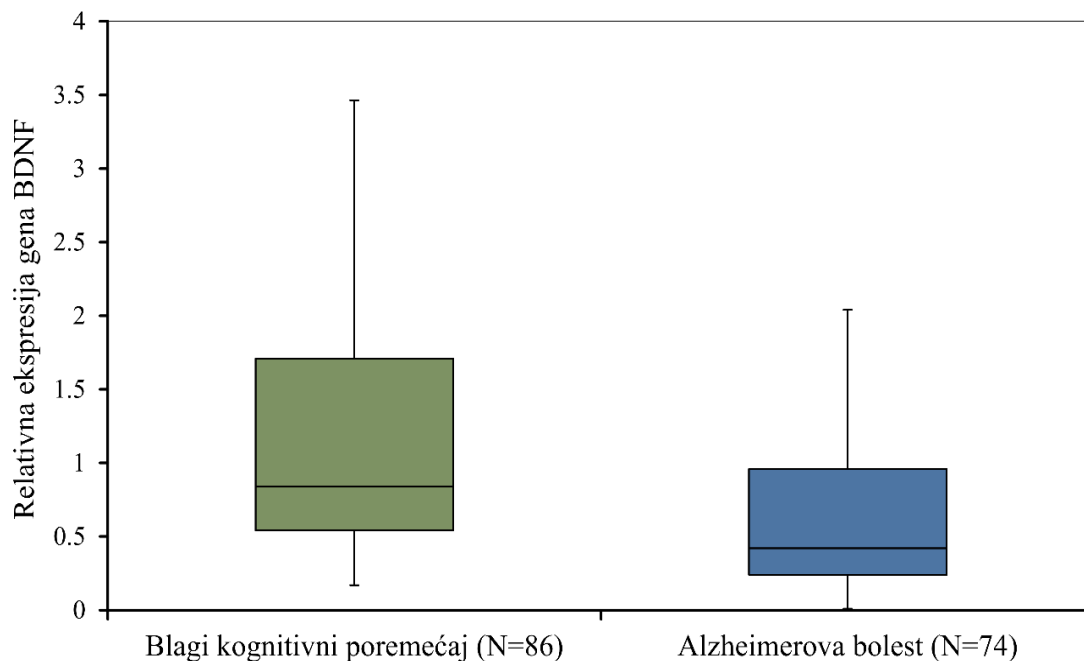
Demografske i kliničke karakteristike ispitanika	Blagi kognitivni poremećaj		Alzheimerova bolest	
	$r_s$	p	$r_s$	p
<b>Dob (godine)</b>	-0,014	0,897	0,089	0,450
<b>ITM (kg/m<sup>2</sup>)</b>	0,028	0,798	-0,071	0,548
<b>Obujam struka (cm)</b>	-0,009	0,935	-0,134	0,256
<b>Ukupni kolesterol (mmol/l)</b>	0,079	0,470	-0,063	0,592
<b>HDL-kolesterol (mmol/l)</b>	0,255	<b>0,018</b>	-0,168	0,152
<b>LDL-kolesterol (mmol/l)</b>	-0,023	0,834	-0,056	0,634
<b>Trigliceridi</b>	-0,010	0,930	0,099	0,401
<b>Glukoza natašte (mmol/l)</b>	0,036	0,742	0,121	0,306

$r_s$ , Spearmanov koeficijent korelacije



#### 4.2.1. Ekspresija gena za moždani neurotrofni čimbenik kod ispitanika oboljelih od AB-a ili MCI-a

Razina relativne ekspresije gena BDNF između ispitanika s MCI-em i ispitanika AB-om uspoređena je Mann-Whitney U testom. Analiza je pokazala da postoji statistički značajna razlika ( $U=1964,5$ ;  $p<0,001$ ) u ekspresiji gena BDNF između dvije skupine ispitanika (Slika 6). Navedena razlika proizlazi iz smanjene ekspresije gena BDNF kod ispitanika s AB-om u odnosu na pojedince s MCI-em (Slika 6).



**Slika 6.** Relativna ekspresija gena BDNF u ispitanika s MCI-em i ispitanika s dijagnozom AB-a.

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 ( $\Delta\Delta Ct$ ) metoda, odnosno relativna ekspresija gena BDNF prikazana je kao  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  vrijednost.

#### 4.2.2. Ekspresija gena za moždani neurotrofni čimbenik i kognitivni simptomi demencije

Za procjenu kognitivnih oštećenja kod obje istraživane skupine ispitanika korišteni su psihometrijski testovi MMSE i CDT.

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

##### 4.2.2.1. Ekspresija gena za moždani neurotrofni čimbenik i test procjene mentalnog stanja

Povezanost broja bodova na testu MMSE i relativne ekspresije gena BDNF u svim uzoraka, bez obzira na dijagnozu, određena je izračunavanjem Spearmanovog koeficijenta korelacije ( $r_s$ ) jer je raspodjela podataka značajno odstupala od normalne razdiobe (Tablica 6). Na isti način analizirana je i povezanost ovih dvaju varijabli zasebno kod ispitanika s dijagnozom AB-a i ispitanika s MCI-em (Tablica 6). Rezultati pokazuju da postoji značajna pozitivna korelacija između broja bodova na testu MMSE i relativne ekspresije gena BDNF kad se gledaju svi ispitanici zajedno ( $p < 0,001$ ), ali taj se trend gubi kada ispitanike podijelimo prema dijagnozi (Tablica 6).

**Tablica 6.** Korelacija relativne ekspresije gena BDNF u ispitanika oboljelih od demencije ili MCI-a s brojem bodova na testu MMSE.

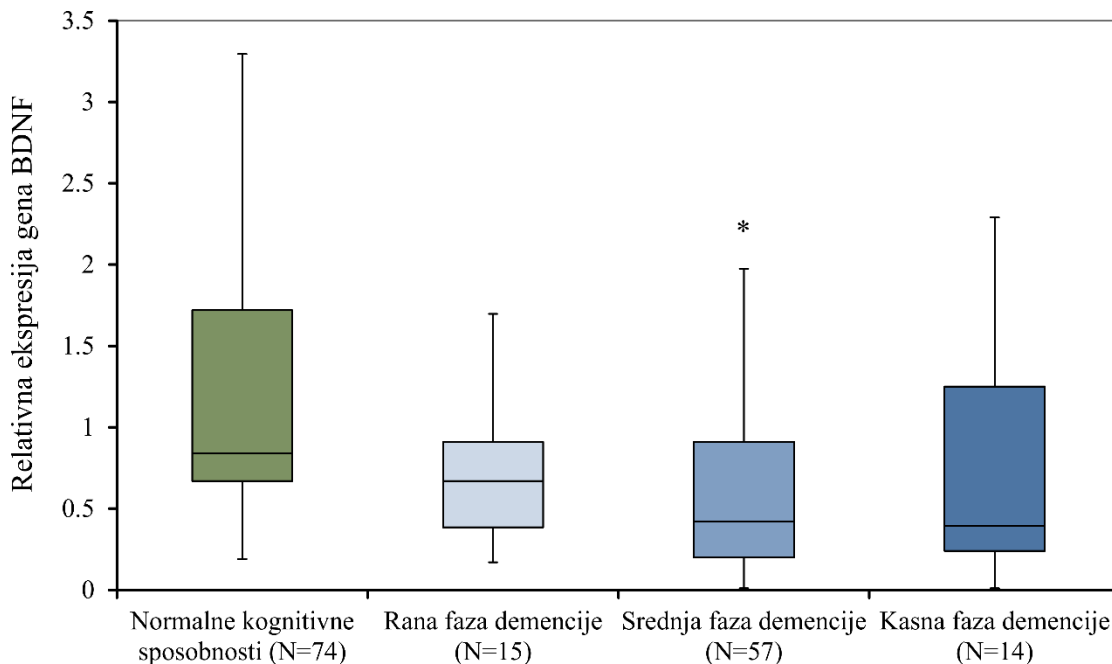
Dijagnoza	$r_s$	p
<b>Svi ispitanici</b> (N=160)	0,321	<b>&lt;0,001</b>
<b>Blagi kognitivni poremećaj</b> (N=86)	0,021	0,851
<b>Alzheimerova bolest</b> (N=74)	0,135	0,253

Kako bi dodatno ispitali povezanost kognitivnih simptoma, određenih prema broju bodova na testu MMSE, i relativne ekspresije gena BDNF, svi ispitanici su prema broju bodova na testu MMSE podijeljeni u 4 skupine (Perneczky i sur., 2006):

- osobe s normalnim kognitivnim sposobnostima (broj bodova od 26 do 30),
- osobe s blagom demencijom (broj bodova od 21 do 25) – rana faza demencije;
- osobe s umjerenom demencijom (broj bodova od 11 do 20) – srednja faza demencije;
- osobe s teškim oblikom demencije (broj bodova  $\leq 10$ ) – kasna faza demencije.

Ispitanici s blagim MCI-em uvršteni su u skupinu osoba s normalnim kognitivnim sposobnostima i u skupini osoba s blagom demencijom.

Usporedba je napravljena između svih ispitanika zajedno pomoću Kruskal-Wallis testa (Slika 7).



**Slika 7.** Relativna ekspresija gena BDNF u ispitanika podijeljenih prema broju bodova na testu MMSE na ispitanike s normalnim kognitivnim sposobnostima te ispitanike u ranoj, srednjoj i kasnoj fazi demencije.

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

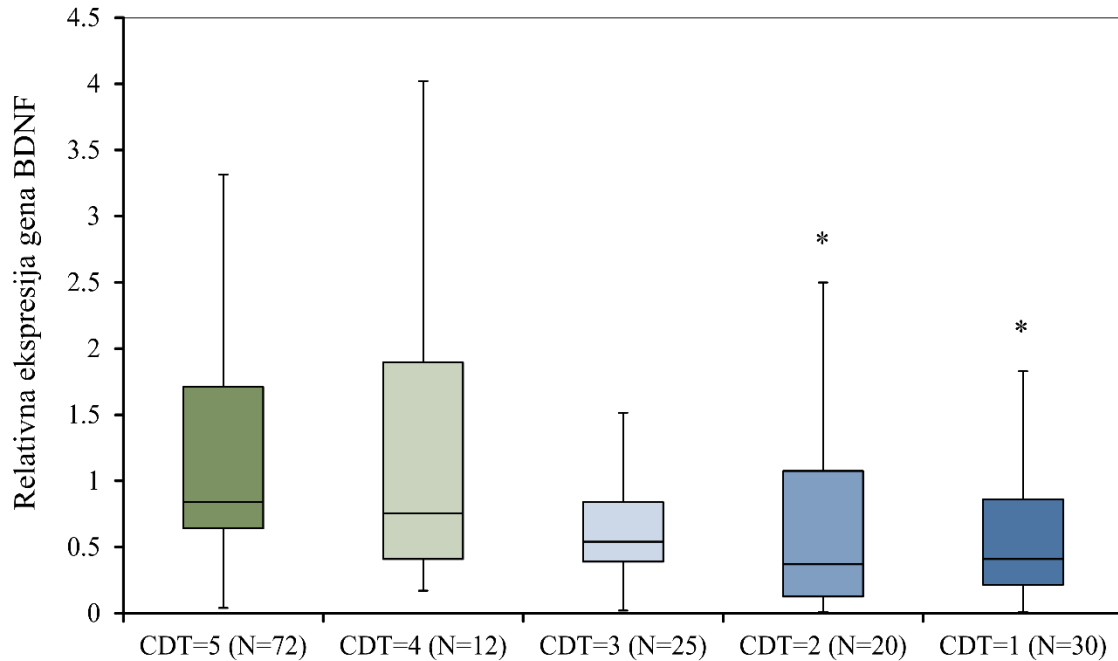
\*  $p < 0,001$  vs. ispitanici s normalnim kognitivnim sposobnostima (post-hoc test)

Rezultati pokazuju da postoji statistički značajna povezanost razine relativne ekspresije gena BDNF s razinom kognitivnog oštećenja procijenjenog pomoću testa MMSE ( $H=22,80$ ;  $df=3$ ;  $p<0,001$ ), a navedena razlika je prvenstveno posljedica značajno niže ekspresije gena BDNF kod ispitanika s umjerenim oštećenjem kognitivnih sposobnosti (srednja faza demencije) u odnosu na ispitanike s normalnim kognitivnim sposobnostima ( $p<0,001$ ; post-hoc test). Sličan trend je vidljiv i u slučaju usporedbe ispitanika s teškim oštećenjem kognitivnih sposobnosti (kasna faza demencije) u odnosu na ispitanike s normalnim kognitivnim sposobnostim, ali navedena razlika nije statistički značajna ( $p=0,051$ ; post-hoc test).

#### *4.2.2.2. Ekspresija gena za moždani neurotrofni čimbenik i test crtanja sata*

Povezanost broja bodova na testu CDT i relativne ekspresije gena BDNF određena je pomoću Kruskal-Wallis testa nakon što su svi ispitanici podijeljeni prema broju bodova na testu CDT u 5 skupina, odnosno na ispitanike s brojem bodova CDT=1, CDT=2, CDT=3, CDT=4 i CDT=5. Većina ispitanika (82,6%) s dijagnozom MCI-a svrstana je u skupinu osoba s normalnim kognitivnim sposobnostima (CDT=5).

Rezultati (Slika 8) pokazuju da postoji statistički značajna povezanost razine relativne ekspresije gena BDNF s razinom kognitivnog oštećenja procijenjenog pomoću testa CDT ( $H=19,43$ ;  $df=4$ ;  $p=0,001$ ), a navedena razlika je prvenstveno posljedica značajno niže ekspresije gena BDNF kod ispitanika s brojem bodova CDT=1 ( $p=0,015$ ; post-hoc test) i CDT=2 ( $p=0,004$ ; post-hoc test), u odnosu na ispitanike s normalnim kognitivnim sposobnostima (broj bodova CDT=5).



**Slika 8.** Relativna ekspresija gena BDNF u ispitanika podijeljenih prema broju bodova na testu CDT na ispitanike s brojem bodova CDT=5, CDT=4, CDT=3, CDT=2 i CDT=1.

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

\*  $p < 0,050$  vs. ispitanici s normalnim kognitivnim sposobnostima, broj bodova CDT=5 (post-hoc test)

### 4.3. Ekspresija gena za katehol-O-metiltransferazu

Metodom kvantitativnog PCR-a, odnosno PCR-a u stvarnom vremenu, određena je razlika u ekspresiji gena COMT kod ispitanika s AB-om i onih s dijagnozom MCI-a. Za relativnu kvantifikaciju ekspresije gena COMT korištena je komparativna Ct ( $\Delta\Delta C_t$ ) metoda, odnosno relativna ekspresija gena COMT prikazana je kao  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  vrijednost.

Normalna razdioba vrijednosti relativne ekspresije gena COMT u uzorcima testirana je Kolmogorov-Smirnovim testom. S obzirom na odstupanje od normalne razdiobe podataka, u svim daljnjim analizama korišteni su neparametrijski testovi za statističku obradu podataka.

S obzirom na potencijalni utjecaj pojedinih demografskih i kliničkih parametara na ekspresiju gena COMT, analizirana je korelacija (Spearmanov koeficijent korelacije,  $r_s$ ) svih demografskih i kliničkih parametara s relativnom ekspresijom gena COMT u obje istraživane skupine ispitanika (Tablica 7). Iz prikazanih rezultata (Tablica 7) vidljivo je da nema značajne povezanosti pojedinih demografskih i kliničkih parametara s razinom relativne ekspresije gena COMT kod ispitanika s AB-om te ispitanika s dijagnozom MCI-a.

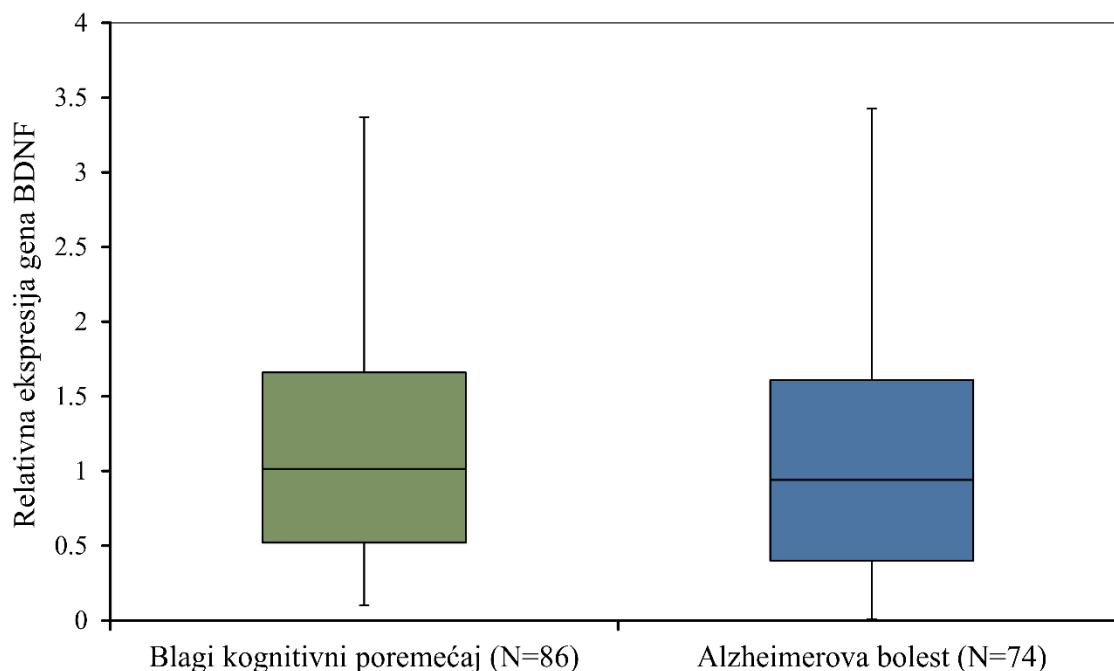
Mogući utjecaj spola na relativnu ekspresiju gena COMT analiziran je u obje skupine ispitanika pomoću Mann-Whitney U testa. U slučaju ispitanika s dijagnozom AB-a nije bilo značajne razlike u relativnoj ekspresiji gena COMT između muškaraca i žena ( $U=603,0$ ;  $p=0,724$ ), a isti trend je uočen i kod ispitanika s MCI-em ( $U=2522,0$ ;  $p=0,055$ ). Zbog svega navedenog nije bilo potrebe za daljnjom korekcijom vrijednosti relativne ekspresije gena COMT za utjecaj dobi, spola, ITM-a, obujma struka, vrijednosti ukupnog kolesterola, HDL-a, LDL-a, triglicerida i glukoze mjerene natašte.

**Tablica 7.** Korelacija relativne ekspresije gena COMT s demografskim i kliničkim parametrima u ispitanika podijeljenih prema dijagnozi na ispitanike s MCI-em i ispitanike s AB-om.

Demografske i kliničke karakteristike ispitanika	Blagi kognitivni poremećaj		Alzheimerova bolest	
	$r_s$	p	$r_s$	p
<b>Dob (godine)</b>	0,073	0,507	-0,151	0,057
<b>ITM (kg/m<sup>2</sup>)</b>	-0,012	0,915	0,184	0,117
<b>Obujam struka (cm)</b>	-0,082	0,451	0,176	0,134
<b>Ukupni kolesterol (mmol/l)</b>	-0,096	0,379	0,036	0,760
<b>HDL-kolesterol (mmol/l)</b>	-0,031	0,775	-0,118	0,317
<b>LDL-kolesterol (mmol/l)</b>	-0,013	0,905	0,062	0,597
<b>Trigliceridi</b>	-0,205	0,058	0,102	0,386
<b>Glukoza natašte (mmol/l)</b>	-0,138	0,204	-0,058	0,626

#### 4.3.1. Ekspresija gena za katehol-O-metiltransferazu kod ispitanika oboljelih od AB-a ili MCI-a

Razina relativne ekspresije gena COMT između ispitanika s MCI-em i ispitanika s AB-om uspoređena je Mann-Whitney U testom. Analiza je pokazala da ne postoji statistički značajna razlika ( $U=2918,0$ ;  $p=0,366$ ) u ekspresiji gena COMT između dvije skupine ispitanika (Slika 9).



**Slika 9.** Relativna ekspresija gena COMT u ispitanika s MCI-em i ispitanika s dijagnozom AB-a.

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 COMT korištena je komparativna Ct ( $\Delta\Delta Ct$ ) metoda, odnosno relativna ekspresija gena COMT prikazana je kao  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  vrijednost.



#### 4.3.2. Ekspresija gena za katehol-O-metiltransferazu i kognitivni simptomi demencije

Za procjenu kognitivnih oštećenja kod obje istraživane skupine ispitanika korišteni su psihometrijski testovi MMSE i CDT.

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

##### 4.3.2.1. Ekspresija gena za katehol-O-metiltransferazu i test procjene mentalnog stanja

Povezanost broja bodova na testu MMSE i relativne ekspresije gena COMT u svim uzoraka, bez obzira na dijagnozu, određena je izračunavanjem Spearmanovog koeficijenta korelacije ( $r_s$ ) jer je raspodjela podataka značajno odstupala od normalne razdiobe (Tablica 8). Na isti način analizirana je i povezanost ovih dvaju varijabli zasebno kod ispitanika s dijagnozom AB-a i ispitanika s MCI-em (Tablica 8). Rezultati pokazuju da ne postoji značajna korelacija između broja bodova na testu MMSE i relativne ekspresije gena COMT kad se gledaju svi ispitanici zajedno, a niti kada ispitanike podijelimo prema dijagnozi (Tablica 8).

**Tablica 8.** Korelacija relativne ekspresije gena COMT u ispitanika oboljelih od AB-a ili MCI-a s brojem bodova na testu MMSE.

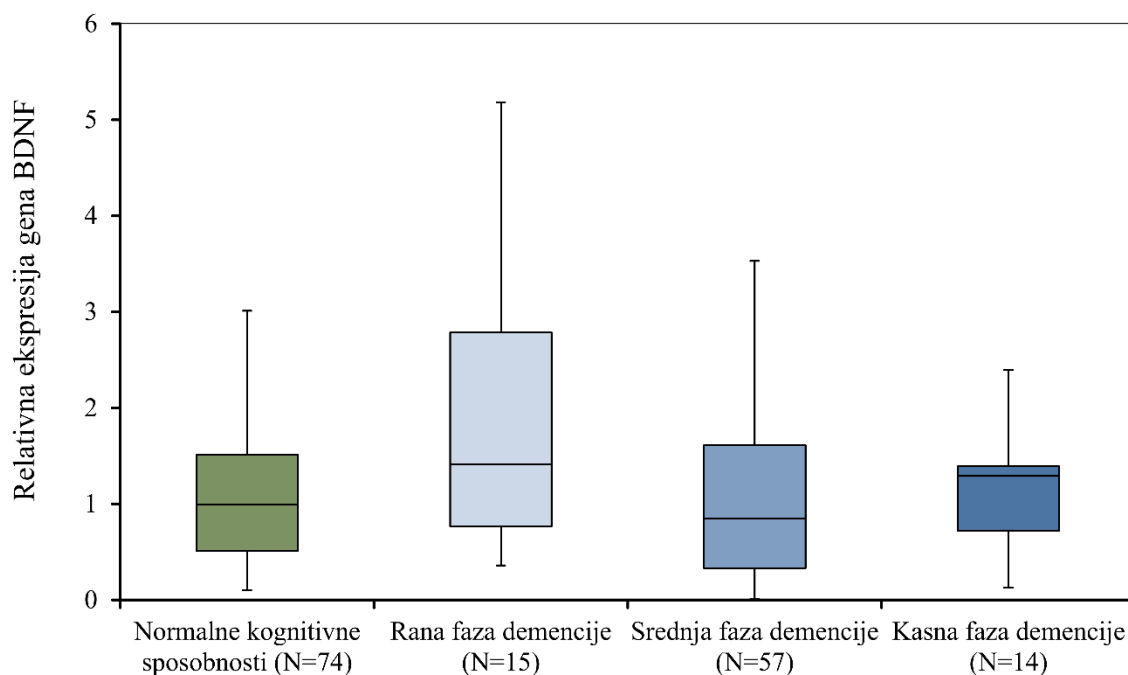
Dijagnoza	$r_s$	p
<b>Svi ispitanici</b> (N=160)	0,043	0,591
<b>Blagi kognitivni poremećaj</b> (N=86)	-0,093	0,394
<b>Alzheimerova bolest</b> (N=74)	0,021	0,856

Kako bi dodatno ispitali povezanost kognitivnih simptoma, određenih prema broju bodova na testu MMSE, i relativne ekspresije gena COMT, svi ispitanici su prema broju bodova na testu MMSE podijeljeni u 4 skupine (Perneckzy i sur., 2006):

- osobe s normalnim kognitivnim sposobnostima (broj bodova od 26 do 30),
- osobe s blagom demencijom (broj bodova od 21 do 25) – rana faza demencije;
- osobe s umjerenom demencijom (broj bodova od 11 do 20) – srednja faza demencije;
- osobe s teškim oblikom demencije (broj bodova  $\leq 10$ ) – kasna faza demencije.

Ispitanici s MCI-em uvršteni su u skupinu osoba s normalnim kognitivnim sposobnostima i u skupini osoba s blagom demencijom.

Usporedba je napravljena između svih ispitanika zajedno pomoću Kruskal-Wallis testa (Slika 10).



**Slika 10.** Relativna ekspresija gena COMT u ispitanika podijeljenih prema broju bodova na testu MMSE na ispitanike s normalnim kognitivnim sposobnostima te ispitanike u ranoj, srednjoj i kasnoj fazi demencije.

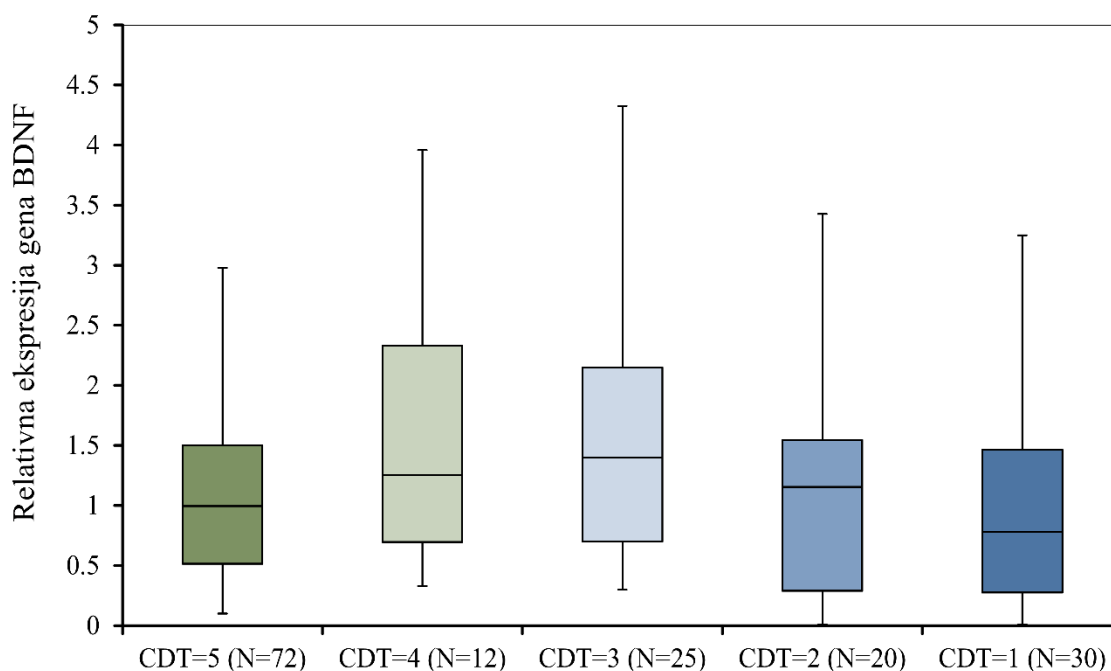
Središnji pravokutnik predstavlja vrijednosti od donjeg do gornjeg kvartila (od 25. do 75. percentila), a središnja linija predstavlja medijan. Horizontalne linije se pružaju od minimalne do maksimalne vrijednosti.

Rezultati pokazuju da ne postoji statistički značajna povezanost razine relativne ekspresije gena COMT s razinom kognitivnog oštećenja procijenjenog pomoću testa MMSE ( $H=5,44$ ;  $df=3$ ;  $p=0,142$ ).

#### 4.3.2.2. Ekspresija gena za moždani neurotrofni čimbenik i test crtanja sata

Povezanost broja bodova na testu CDT i relativne ekspresije gena COMT određena je pomoću Kruskal-Wallis testa nakon što su svi ispitanici podijeljeni prema broju bodova na testu CDT u 5 skupina, odnosno na ispitanike s brojem bodova CDT=1, CDT=2, CDT=3, CDT=4 i CDT=5. Većina ispitanika (82,6%) s dijagnozom MCI-a svrstana je u skupinu osoba s normalnim kognitivnim sposobnostima (CDT=5).

Rezultati (Slika 11) pokazuju da ne postoji statistički značajna povezanost razine relativne ekspresije gena COMT s razinom kognitivnog oštećenja procijenjenog pomoću testa CDT ( $H=4,66$ ;  $df=4$ ;  $p=0,324$ ).



**Slika 11.** Relativna ekspresija gena BDNF u ispitanika podijeljenih prema broju bodova na testu CDT na ispitanike s brojem bodova CDT=5, CDT=4, CDT=3, CDT=2 i CDT=1.

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.

## 5. RASPRAVA

Zbog sve većeg broja progresivnih demencija u populaciji i zbog brojnih neodgovorenih pitanja vezanih uz njihovu etiologiju i patologiju, provode se brojna istraživanja koja kroz različite pristupe nastoje utvrditi čimbenike rizika, biomarkere, patološke mehanizme, potencijalne terapijske pristupe te otkrivanje razlika između normalnih simptoma starenja, MCI-a i demencije. Na nastanak demencije i na simptome koji će biti prisutni utječu brojni čimbenici pa često dolazi do konfliktnih rezultata istraživanja, što dodatno upućuje na kompleksnu podlogu ovog sindroma (Cunningham i sur, 2015). Zbog nedostatka pouzdanih podataka u literaturi, cilj ovog rada je istražiti postoji li povezanost razine ekspresije gena za BDNF i COMT u stanicama periferne krvi s razvojem demencije. Cilj je također istražiti može li se ekspresija ova dva navedena gena povezati i s razinom kognitivnog oštećenja kod osoba oboljelih od demencije, odnosno osoba s dijagnozom MCI-a.

Neuroprotektivni učinci BDNF-a, njegova uloga u regulaciji neurotransmiterskih sustava te njegova uloga u patogenezi AB-a opsežno su istraživani, a poslijednjih godina istražuje se kao potencijalni biomarker za razvoj demencije. Klein i sur. su 2011. na životinjskim modelima dokazali da postoji korelacija između količine BDNF-a u perifernoj krvi i količine BDNF-a u hipokampusu.

COMT utječe na kognitivnu kontrolu i funkcije kod ljudi te se upravo zbog toga dovodi i u vezu s razvojem demencije. S obzirom na saznanja da je funkcija dopaminskog sustava poremećena kod osoba s dijagnozom AB-a te da postoji značajna razlika između muškaraca i žena što se tiče učestalosti i progresije bolesti, uloga COMT-a i njegovih polimorfizama također su predmet brojnih istraživanja (Serreti i Olgiati, 2012).

Budući da patogeneza AB-a započinje mnogo godina prije pojave simptoma, liječenje je dodatno otežano zbog kaskadnih mehanizama koji se aktiviraju kao posljedica patologije bolesti. Ranija detekcija olakšala bi terapiju i upravo zbog toga je cilj ovog istraživanja utvrditi može li se preko ekspresije BDNF-a i COMT-a u perifernoj krvi uspostaviti pouzdani biomarker za razvoj demencije.

Većina pacijenata s dijagnozom MCI-a s vremenom razvije simptome demencije što ih čini odličnom ciljnom skupinom u istraživanjima (Chertkow, 2002), stoga smo u ovom istraživanju

nastojali utvrditi povezanost razine kognitivnog oštećenja kod osoba s dijagnozom AB-a, odnosno MCI-a.

Sukladno očekivanjima, usporedba skupina s obzirom na dijagnozu pokazala je da su ispitanici s dijagnozom AB-om značajno stariji od ispitanika s dijagnozom MCI-a. Također u skladu s očekivanjima, potvrđen je značajno manji broj bodova na provedenim psihometrijskim testovima MMSE i CDT kod skupine s dijagnozom AB-a u odnosu na skupinu s dijagnozom MCI-a. U obje skupine nije bilo značajne razlike u relativnoj ekspresiji BDNF-a između muškaraca i žena, taj rezultat je u skladu sa studijama koje su proveli Yasutake i sur.(2006) te Siuda i sur.(2017).

U ovom istraživanju nije uočena korelacija ostalih demografskih i kliničkih parametara s razinom relativne ekspresije BDNF-a kod obje skupine, osim u slučaju koncentracije HDL-a gdje je uočena značajna korelacija kod skupine s dijagnozom MCI-a. U istraživanju koje su proveli Nascimento i sur. (2015) također je uočena korelacije razine HDL-a i BDNF-a u perifernoj krvi kod osoba s MCI-em, ali rezultate su mjerili iz seruma nakon programa fizičke aktivnosti koji je trajao 16 tjedana. Reitz i sur. (2008) su u svom istraživanju zaključili da nema povezanosti između razine lipida u krvi s razvojem MCI-a. Rezultat dobiven u našem istraživanju svakako nije bio dovoljan za korekciju vrijednosti relativne ekspresije BDNF-a za utjecaj kliničkih i demografskih parametara, ali upućuje na potrebu za daljnjim istraživanjima utjecaja lipoproteina na razvoj kognitivnih poremećaja budući da su u literaturi često prisutni oprečni rezultati.

U slučaju gena *BDNF* naši rezultati su pokazali da je kod osoba s AB-om snižena ekspresija ovog gena u odnosu na ispitanike s dijagnozom MCI-a. Smanjena razina BDNF-a kod ispitanika s AB-om može biti povezana s činjenicom da je ta skupina u prosjeku značajno starija od skupine ispitanika s dijagnozom MCI-a. Upravo zbog navedenog, u našem istraživanju provjerili smo povezanost ekspresije gena *BDNF* s dobi u obje skupine ispitanika te smo dob isključili kao potencijalni faktor utjecaja. Također, istraživanje je pokazalo da postoji značajna pozitivna korelacija između broja bodova na testu MMSE i relativne ekspresije gena *BDNF* kad se gledaju svi ispitanici zajedno. Rezultati su potvrdili statistički značajnu povezanost razine relativne ekspresije gena *BDNF* s razinom kognitivnog oštećenja procijenjenog pomoću testa MMSE, a navedena razlika je prvenstveno posljedica značajno niže ekspresije gena *BDNF* kod ispitanika s umjerenim oštećenjem kognitivnih sposobnosti (srednja faza demencije) u odnosu na ispitanike s normalnim kognitivnim sposobnostima. U slučaju procjene kognitivnih sposobnosti testom CDT,

utvrđena je značajna povezanost razine relativne ekspresije gena *BDNF* s razinom kognitivnog oštećenja procijenjenog pomoću testa CDT, a navedena razlika je prvenstveno posljedica značajno niže ekspresije gena *BDNF* kod ispitanika s izraženim oštećenjem kognitivnih funkcija (CDT = 1-2). U literaturi nema istraživanja koja uspoređuju ekspresiju *BDNF*-a kod AB-a i MCI-a iz uzoraka cijele krvi, ali provedena su istraživanja na količini ovog peptida u serumu. Rezultati ovih studija također su često konfliktni. Gezen-Ak i sur. (2013) te Siuda i sur. (2017) zaključili su da je razina *BDNF*-a manja kod ispitanika s AB-om nego s MCI-em, Angelucci i sur (2010) su dobili rezultate koji ukazuju da je razina *BDNF*-a povišena kod obje skupine.

Relativna razina ekspresije gena za *COMT* uspoređena je sa istim parametrima kao i za *BDNF* (kliničke i demografske značajke, usporedba skupine s AB-om i MCI-em, rezultati psihometrijskih testova MMSE i CDT), ali dobiveni rezultati ukazuju da nema korelacije razine genske ekspresije s niti jednim od korištenih parametara. Manjak korelacije upućuje na to da relativna razina ekspresije gena za *COMT* dobivena iz uzoraka krvi nije dobar pokazatelj razine kognitivnih oštećenja prisutnih kod ispitanika s dijagnozom AB-a ili MCI-a niti da se preko mjerenja ovog parametra može procijeniti rizik za oboljevanje od demencije. Međutim, u literaturi postoje nova istraživanja koja indiciraju da relativna razina ekspresije *COMT*-a iz uzoraka periferne krvi može biti pokazatelj nekih drugih parametara. Ni i sur (2021) su koristeći iste metode uspoređivali razinu ekspresije gena za *COMT* kod zdravih osoba i osoba s dijagnozom shizofrenije, bipolarnog poremećaja i depresije s kojima su također povezani poremećaji dopaminskog sustava. Njihovi rezultati ukazuju da u usporedbi sa zdravim pojedincima, osobe s dijagnozom shizofrenije imaju značajno slabiju ekspresiju gena za *COMT*, dok je ekspresija pojačana kod osoba s dijagnozom bipolarnog poremećaja.

Rezultati ovog istraživanja potvrđuju da je razina ekspresije *BDNF*-a na periferiji povezana s kognitivnim oštećenjima kod ispitanika oboljelih od AB-a. Međutim, treba naglasiti da se mjerenje razine ekspresije *BDNF*-a u perifernoj krvi nikako ne može smatrati čimbenikom koji bi samostalno mogao biti pokazatelj rizika za razvoj demencije ili precizan pokazatelj razine kognitivnog oštećenja.

Također, u ovom istraživanju uočena je značajna korelacija koncentracije HDL-a i razine ekspresije *BDNF*-a, ali samo kod ispitanika s MCI-em. U našem uzorku nije potvrđena ni korelacija ekspresije *BDNF*-a s preostalim lipidnim parametrima (ukupni kolesterol, LDL, trigliceridi),

razinom glukoze natašte te s metaboličkim čimbenicima rizika (ITM i opseg struka). Svejedno, navedena korelacija ekspresije gena *BDNF* i razine HDL-a kod osoba s dijagnozom MCI-a upućuje na potrebu daljnjih analiza interakcije *BDNF*-a i razine lipida, pogotovo zbog indikacija da *BDNF* igra određenu ulogu u metabolizmu lipida i glukoze.

Zbog raznih polimorfizama *BDNF*-a, *COMT*-a, ali i drugih gena kao što su *APOE*, *PSEN1* i *PSEN2*, u budućim istraživanjima trebalo bi uzeti u obzir i pojedine polimorfizme navednih gena, uključiti potpuno zdrave, ali dovoljno stare, ispitanike i pratiti razinu ekspresije gena *BDNF* i *COMT* kroz duži vremenski period.



## 6. ZAKLJUČAK

- Kao što je i očekivano, skupina ispitanika s AB-om starija je od skupine ispitanika s dijagnozom MCI-a te pokazuje znatnije oštećenje kognitivnih funkcija prema MMSE i CDT testovima. Međutim, dvije grupe ispitanika ne razlikuju se značajno u ostalim kliničkim i demografskim podacima (ITM, obujam struka, ukupni kolesterol, LDL, HDL, trigliceridi, glukoza natašte).
- Pojedini demografski i klinički parametri nisu povezani s razinom relativne ekspresije gena *BDNF* kod ispitanika s AB-om te ispitanika s dijagnozom MCI-a. Jedino u slučaju HDL-a prisutna je značajna korelacija s razinom ekspresije gena *BDNF*, ali samo kod ispitanika s MCI-em. U obje skupine ispitanika nema značajne razlike u relativnoj ekspresiji gena *BDNF* između muškaraca i žena.
- Razina relativne ekspresije gena *BDNF* smanjena je kod ispitanika s AB-om u odnosu na pojedince s MCI-em.
- Kad se gledaju svi ispitanici zajedno vidljiva je pozitivna korelacija između relativne ekspresije gena *BDNF* i broja bodova na testu MMSE, međutim, taj trend nije vidljiv kada se ispitanici podijele prema dijagnozi.
- Značajna povezanost razine relativne ekspresije gena *BDNF* s razinom kognitivnog oštećenja procijenjenog pomoću testa MMSE vidljiva je i kada se ispitanici podijele u grupe prema broju bodova ostvarenih na testu MMSE. Navedena razlika proizlazi iz snižene ekspresije gena *BDNF* kod ispitanika s umjerenim oštećenjem kognitivnih sposobnosti i ispitanika s teškim oštećenjem kognitivnih sposobnosti u odnosu na ispitanike s normalnim kognitivnim sposobnostim.
- Istraživanje upućuje i na statistički značajnu povezanost razine relativne ekspresije gena *BDNF* s razinom kognitivnog oštećenja procijenjenog pomoću testa CDT, a navedena razlika proizlazi iz značajno niže ekspresije gena *BDNF* kod ispitanika s težim kognitivnim oštećenjem u odnosu na ispitanike s normalnim kognitivnim sposobnostima
- Ekspresija gena *COMT* nije povezana s pojedinim demografskim i kliničkim parametrima i ne razlikuje se između skupine ispitanika s dijagnozom AB-a i skupine s MCI-em. Relativna ekspresija gena *COMT* ne korelira s brojem bodova na testu MMSE niti je povezana s razinom kognitivnog oštećenja procijenjenog pomoću testa CDT.
- Ovo istraživanje daje bolji uvid u ulogu BDNF-a u demenciji, točnije u ulogu ovog neurotrofina u razvoju kognitivnih simptoma demencije.

## 7. LITERATURA

Angelucci F, Spalletta G, di Iulio F, Ciaramella A, Salani F, Colantoni L, Varsi AE, Gianni W, Sancesario G, Caltagirone C, Bossù P(2010): Alzheimer's disease (AD) and Mild Cognitive Impairment (MCI) patients are characterized by increased BDNF serum levels. *Current Alzheimer Research*, 7(1), 15-20

Arlington, VA (2013): Diagnostic and statistical manual of mental disorders. *American Psychiatric Association*. (5th ed.)

Binder DK, Scharfman HE (2004): Mini Review. *Growth Factors*, 22:3, 123-131

Chertkow H (2002): Mild cognitive impairment. *Current Opinion in Neurology*, 15(4), 401-7

Cockrell JR, Folstein MF (1988): Mini-Mental State Examination (MMSE). *Psychopharmacology Bulletin*, 24, 689-92

Conover WJ (1999): Practical nonparametric statistics, 3rd edition. *New York: John Wiley & Sons*.

Cunningham EL, McGuinness B, Herron B, Passmore AP (2015): Dementia. *Ulster Medical Journal*, 84, 79-87

Delabio R, Rasmussen L, Mizumoto I, Viani GA, Chen E, Villares J, Costa IB, Turecki G, Linde SA, Smith MC, Payão SL (2014): PSEN1 and PSEN2 gene expression in Alzheimer's disease brain: a new approach. *Journal of Alzheimer's Disease*, 42(3), 757-60.

Deture MA, Dickson DW (2019): The neuropathological diagnosis of Alzheimer's disease, *Molecular Neurodegeneration*, 5, 1-18.

Dickinson D, Elvevåg B (2009): Genes, cognition and brain through a COMT lens. *Neuroscience*, 164 (1), 72-87

Diniz BS, Teixeira AL (2011): Brain-Derived Neurotrophic Factor and Alzheimer's Disease: Physiopathology and Beyond. *Neuromolecular Medicine*, 13, 217–222

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

Folstein MF, Folstein SE, McHugh PR (1975): "Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *Journal of psychiatric research*, 12, 189-98.

Gezen-Ak D, Dursun E, Hanağası H, Bilgiç B, Lohman E, Araz ÖS, Atasoy IL, Alaylıoğlu M, Önal B, Gürvit H, Yılmaz S (2013): BDNF, TNF $\alpha$ , HSP90, CFH, and IL-10 serum levels in patients with early or late onset Alzheimer's disease or mild cognitive impairment. *Journal of Alzheimer's Disease*, 37(1), 185-95

Jack CR, Jr., Albert MS, Knopman DS, McKhann GM, Sperling RA, Carrillo MC, Thies B, Phelps CH (2011): Introduction to the recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association*, 7, 257-262.

Jakob-Roetne R, Jacobsen H (2009): Alzheimer s Disease : From Pathology to Therapeutic Approaches. *Angewandte Chemie*, 48(17), 3030-59

Kim J, Basak JM, Holtzman DM (2009): Review The Role of Apolipoprotein E in Alzheimer's Disease. *Neuron*, 63(3), 287-303

Koch G, Esposito Z, Codecà C, Mori F, Kusayanagi H, Monteleone F, Di Lorenzo F, Bernardi G, Martorana A (2011): Altered dopamine modulation of LTD-like plasticity in Alzheimer's disease patients. *Clinical Neurophysiology*, 122(4), 703-7

Klein AB, Williamson R, Santini MA, Clemmensen C, Ettrup A, Rios M, Knudsen GM, Aznar S (2011): Blood BDNF concentrations reflect brain-tissue BDNF levels across species. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 14(3), 347-53

Leal G, Bramham CR, Duarte CB (2017): BDNF and Hippocampal Synaptic Plasticity. *Vitamins and Hormones*, 104(1), 153-95

Lin KA, Doraiswamy PM (2015): When Mars Versus Venus is Not a Cliché: Gender Differences in the Neurobiology of Alzheimer's Disease. *Frontiers in Neurology*, 5, 288

Livak KJ, Schmittgen TD (2001): Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C(T)}$  Method. *Methods*, 25, 402-408.

Minati L, Edginton T, Bruzzone MG, Giaccone G (2009): Current concepts in Alzheimer's disease: a multidisciplinary review. *American Journal of Alzheimer's disease and other dementias*, 24(2), 95-121

Miranda M, Morici JF, Zanoni MB, Bekinschtein P (2019): Brain-Derived Neurotrophic Factor : A Key Molecule for Memory in the Healthy and the Pathological Brain. *Frontiers in cellular neuroscience*, 13, 1-25

Mizuno M, Yamada K, Olariu A, Nawa H, Nabeshima T (2000): Involvement of Brain-Derived Neurotrophic Factor in Spatial Memory Formation and Maintenance in a Radial Arm Maze Test in Rats. *The Journal of Neuroscience*, 20(18), 7116-21

Namba Y, Tomonaga M, Kawasaki H, Otomo E, Ikeda K (1991): Apolipoprotein E immunoreactivity in cerebral amyloid deposits and neurofibrillary tangles in Alzheimer ' s disease and kuru plaque amyloid in Creutzfeldt-Jakob disease. *Brain Research*, 54, 163-6

Nascimento CM, Pereira JR, Pires de Andrade L, Garuffi M, Ayan C, Kerr DS, Talib LL, Cominetti MR, Stella F (2015): Physical exercise improves peripheral BDNF levels and cognitive functions in mild cognitive impairment elderly with different bdnf Val66Met genotypes. *Journal of Alzheimer's Disease*, 43(1), 81-91

Ni P, Liu M, Wang D, Tian Y, Zhao L, Wei J, Yu X, Qi X, Li X, Yu H, Ni R, Ma X, Deng W, Guo W, Wang Q, Li T (2021): Association Analysis Between Catechol-O-Methyltransferase Expression and Cognitive Function in Patients with Schizophrenia, Bipolar Disorder, or Major Depression. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, 17, 567-574

Nikolac Perković, M (2015): Uloga moždanog neurotrofnog čimbenika u demenciji. *doktorska disertacija, Sveučilišni poslijediplomski interdisciplinarni doktorski studij Molekularne bioznanosti, Osijek*

Nikolac Perković M, Švob Štrac D, Tudor L, Konjevod M, Nedić Erjavec G, Pivac N (2018): Catechol-O-methyltransferase, Cognition and Alzheimer's Disease. *Current Alzheimer Research*, 15(5), 408-19

Petersen RC (2011): Mild cognitive impairment. *The New England Journal of Medicine*, 364, 2227-34

Prince MJ, Wimo A, Guerchet MM, Ali GC, Wu Y-T, Prina M (2015): World Alzheimer Report 2015 - The Global Impact of Dementia: An analysis of prevalence, incidence, cost and trends. London: *Alzheimer's Disease International*, 84p

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

Priller C, Bauer T, Mitteregger G, Krebs B, Kretschmar HA, Herms J (2006): Synapse Formation and Function Is Modulated by the Amyloid Precursor Protein. *The Journal of Neuroscience*, 26(27), 7212-21

Reitz C, Mayeux R (2014): Alzheimer disease : Epidemiology , diagnostic criteria , risk factors and biomarkers. *Biochemical Pharmacology*, 88(4), 640-51

Querfurth HW, LaFerla FM (2018): Alzheimer's Disease. *The New England Journal of Medicine*, 362(4), 329-44

Savva GM, Arthur A (2015): Who has undiagnosed dementia? A cross-sectional analysis of participants of the Aging, Demographics and Memory Study. *Age and Ageing*, 44(4), 642-7

Serretti A, Olgiati P (2012): Catechol-O-Methyltransferase and Alzheimer's Disease: A Review of Biological and Genetic Findings. *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets*, 11(3), 299-305

Siuda J, Patalong-Ogiewa M, Żmuda W, Targosz-Gajniak M, Niewiadomska E, Matuszek I, Jędrzejowska-Szypułka H, Lewin-Kowalik J, Rudzińska-Bar M (2017): Cognitive impairment and BDNF serum levels. *Neurologia i Neurochirurgia Polska*, 51(1), 24-32

Yamada K, Mizuno M, Nabeshima T (2002): Role for brain-derived neurotrophic factor in learning and memory. *Life Sciences*, 70 (7), 735-44

Yasutake C, Kuroda K, Yanagawa T, Okamura T, Yoneda H (2006): Serum BDNF, TNF-alpha and IL-1beta levels in dementia patients: comparison between Alzheimer's disease and vascular dementia. *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience*, 256(7), 402-6

## 8. ŽIVOTOPIS

**Ime i prezime:** Srećko Bovan

**Datum rođenja:** 02.02.1997.

**Obrazovanje:**

2018.-2021. **Diplomski sveučilišni studij Eksperimentalna biologija; Fiziologija i imunobiologija**

Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Biološki odsjek, Zagreb (Republika Hrvatska)

2015.-2018. **Preddiplomski studij Biologija i ekologija mora**

Sveučilište u Splitu, Sveučilišni odjel za studije mora, Split (Republika Hrvatska)

**Radno iskustvo:**

2020.-2021. Suradnik za farmakovigilanciju

Primevigilance d.o.o. Zagreb

2021. Laboratorijska stručna praksa

Institut Ruđer Bošković, Zavod za molekularnu medicinu, Laboratorij za molekularnu neuropsihijatriju

Mentorica: dr.sc. Matea Nikolac Perković

2019. Laboratorijska stručna praksa

Prirodoslovno-matematički fakultet, Biološki odsjek, Zavod za animalnu fiziologiju

Mentor: prof.dr.sc. Duje Lisičić

**Dodatno:**

2018.-2019. Tečaj za osposobljavanje osoba koje rade s pokusnim životinjama: LabAnim A kategorija (Laboratory Animal Science Course: FELASA equivalent (60 sati))

**Festival znanosti**

Manifestacija koja promiče znanost.