

# Protein S100B u Alzheimerovoj demenciji

---

Đikić, Iva

Master's thesis / Diplomski rad

2016

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:982067>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-25**



Repository / Repozitorij:

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



**Iva Đikić**

# **Protein S100B u Alzheimerovoj demenciji**

## **DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2016.

*Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Klinička biokemija organa i organskih sustava 1 Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Zagreb pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Dunje Rogić i dr. sc. Željke Vogrinc, znanstvene suradnice.*

*Veliku zahvalnost, u prvom redu, dugujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Dunji Rogić i suvoditeljici dr. sc. Željki Vogrinc, znanstvenoj suradnici na podršci i strpljenju pri osmišljavanju i izradi ovog rada.*

*Također, želim zahvaliti svim mojim prijateljima i prijateljicama bez kojih ovo studiranje ne bi prošlo tako lako. Posebno želim zahvaliti odbojkaškom klubu Don Bosco i svim članicama seniorske ekipe, isto kao i članicama odbojkaške ekipe Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta što su svojom prisutnošću u sportskim trenucima i uspjesima unijele posebnu radost u moje studiranje.*

*I na kraju, najveću zahvalu želim izreći svojim roditeljima Višnji i Danku, sestri Karli i Mateju za pruženu ljubav i potporu bez kojeg ova obrana ne bi bila moguća.*

*Velika HVALA svima!*

## **KRATICE**

AD= Alzheimerova demencija

SP= eng. senile plaque = senilni plakovi

NFT= eng. neurofibrillary tangles = neurofibrilarni snopići

EOAD= eng. Early onset Alzheimer's disease = rani oblik Alzheimerove demencije

LOAD= eng. Late onset Alzheimer's disease = kasni oblik Alzheimerove demencije

APP= eng. amyloid precursor protein = prekursor proteina amiloida

PSN= presenilin

ApoE = apolipoprotein E

A $\beta$  = amiloid  $\beta$

AICD = eng. APP intracellular domain = APP unutarstanična domena

Tau = tubulin associated unit

MAP = microtubule associated protein

t-tau = eng. Total tau = ukupni tau

p-tau = eng. Phosphorylated tau = fosforilirani tau

ESMO = eng. European society for medical oncology

TBI = eng. traumatic brain injury = traumatska ozljeda mozga

IL-1 = interleukin 1

NSAID = eng. Non-steroidal anti-inflammatory drugs = nesteroidni protuupalni lijekovi

RAGE = eng. Receptor for advanced glycation endproducts = receptor za glikacijske produkte

AGE = advanced glycation endproducts

NSC = eng. Neural stem cells = neuralne matične stanice

DKK1 = Dikkopf 1

UPS = eng. Ubiquitin proteasome system = ubikvitin proteosomski sustav

ELISA = eng. Enzyme linked immunosorbent assay = enzimimunokemijska metoda

IATI = INNOTEST Amyloid tau index

ECLIA = eng. electrochemiluminescence immunoassay = imunokemijska metoda elektrokemiluminiscencije

# SADRŽAJ

## 1. UVOD

|  |          |
|--|----------|
| <b>1.1. Demencije</b> .....                | <b>1</b> |
| <b>1.2. Alzheimerova demencija</b> .....   | <b>2</b> |
| 1.2.1. Hipoteza amiloidne kaskade .....    | 4        |
| 1.2.2. Tau protein .....                   | 6        |
| 1.2.3. Biomarkeri AD.....                  | 7        |
| <b>1.3. S100</b> .....                     | <b>8</b> |
| 1.3.1. S100 i Alzheimerova demencija ..... | 11       |

## 2. OBRAZLOŽENJE TEME.....15

## 3. MATERIJALI I METODE.....16

|   |           |
|---|-----------|
| <b>3.1. Ispitanici s AD</b> .....                     | <b>16</b> |
| <b>3.2. Kontrolna skupina</b> .....                   | <b>16</b> |
| <b>3.3. METODE</b> .....                              | <b>16</b> |
| 3.3.1. Određivanje $A\beta_{1-42}$ .....              | 16        |
| 3.3.2. Određivanje p-tau <sub>(181p)</sub> .....      | 17        |
| 3.3.3. Određivanje (t-tau).....                       | 18        |
| 3.3.4. Program «Visualization of AD biomarkers» ..... | 19        |
| 3.3.5. Određivanje S100B .....                        | 20        |
| 3.3.6. Statistička obrada .....                       | 22        |

## 4. REZULTATI I RASPRAVA .....

|  |           |
|--|-----------|
| <b>4.1. REZULTATI</b> .....  | <b>23</b> |
| 4.1.1. Korelacija S100 i p-tau .....   | 29        |
| 4.1.2. Korelacija između S100 i t-tau .....  | 30        |
| 4.1.3. Korelacija S100 i $\beta$ -amiloida .....                                   | 31        |
| 4.1.4. Korelacija između S100 i omjera t-tau/ $\beta$ amiloid <sub>42</sub> .....  | 32        |
| 4.1.5. Korelacija između S100 i omjera p-tau/ $\beta$ amiloida <sub>42</sub> ..... | 33        |
| <b>4.2. RASPRAVA</b> .....   | <b>35</b> |

## 5. ZAKLJUČCI .....

## 6. LITERATURA .....

## 7. SAŽETAK .....

|                         |           |
|-------------------------|-----------|
| <b>8. SUMMARY .....</b> | <b>43</b> |
|-------------------------|-----------|

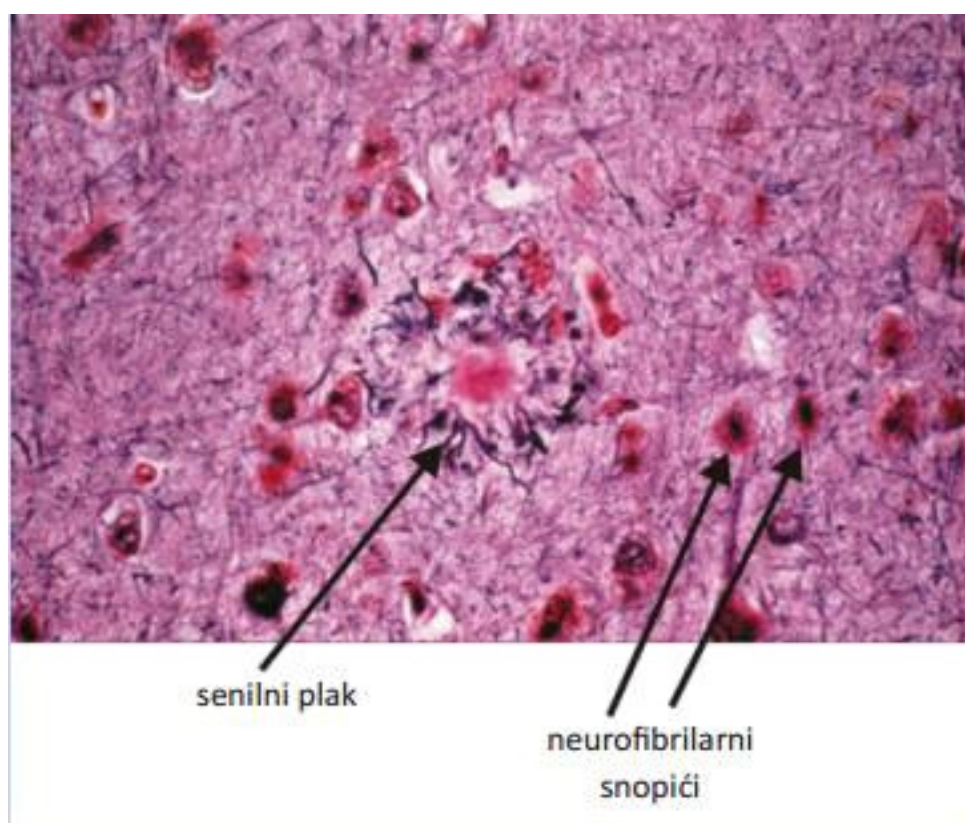
# 1. UVOD

## 1.1. Demencije

Demencija je jedan od najčešćih sindroma koji se susreće u svakodnevnoj praksi neurologa, neuropsihijatarata i psihologa, a starenjem populacije postaje jedan od najvažnijih socijalno-medicinskih problema. Demencija (lat. de –bez, mens –um ) je klinički sindrom obilježen stečenim gubitkom kognitivnih i emotivnih sposobnosti koji je prisutan u tolikoj mjeri da ometa svakodnevnu aktivnost oboljelog i značajno smanjuje njegovu kvalitetu života. Pojam demencija ne uključuje specifičan uzrok niti patološki proces i ne može se promatrati kao određena bolest, već je to zajednički naziv za brojne neuropsihološke promjene koje se pojavljuju kao posljedica različitih bolesti mozga. S obzirom na patološke uzroke, demencija može nastati kao posljedica brojnih bolesti: neurodegenerativnih, vaskularnih, zaraznih, autoimunih, traumatskih, metabličko-toksičkih, neoplastičnih i dr. S obzirom na progresiju bolesti, demencije se mogu podijeliti u kronične neprogresivne i kronične progresivne encefalopatije. Kronične neprogresivne encefalopatije su rjeđe i nastaju obično zbog ozljede mozga i hipoksije. Kronične progresivne encefalopatije mogu su češće i više je mogućih uzroka poremećaja ( vaskularne demencije, metaboličko-toksičke; nedostatak vitamina, bolesti nakupljanja, endokrini poremećaji, neurodegenerativne bolesti). Po zahvaćenosti određenih dijelova mozga ova najvažnija skupina progresivno kroničnih encefalopatija dijeli se na kortikalne, kortikalno-subkortikalne, subkortikalne i multifokalne encefalopatije. Najčešća kronična progresivna kortikalna encefalopatija je Alzheimerova demencija (AD). Uz nju u ovoj skupini demencija su i frontotemporalna demencija, Pickova bolest, Braakova demencija i nasljedne taupatije. Najučestalije kortikalno-subkortikalne encefalopatije su bolest Lewyjevih tjelešaca, vaskularna demencija i alkoholna encefalopatija. Najvažnije kortikalne encefalopatije su Huntigtonova i Parkinsonova bolest. U kronično progresivne multifokalne encefalopatije spadaju spongioformne encefalopatije (Creutzfeldt-Jakobova bolest), multipla skleroza, progresivna leukoencefalopatija i dr. (Trbojević-Čepe , Vogrinc, ured.,2012)

## 1.2. Alzheimerova demencija

1901. godine dr. Lois Alzheimer je prvi opisao slučaj bolesti koja je kasnije nazvana po njemu, Alzheimerova demencija (AD). Prva pacijentica, 51 godinu stara, sa kliničkom slikom prerano razvijene demencije se zvala Auguste Deter. Zaprimljena je u psihijatrijsku ustanovu, zbog psihijatrijskih simptoma koji su koegzistirali sa prisutnom presenilnom demencijom ( Šimić i sur., 2016). Nakon njene smrti, proučavao je njen mozak i posebnim tehnikama bojenja zapazio je dvije karakteristične pojave koje su ključne za dijagnozu Alzheimerove bolesti, senilne plakove (senile plaque-SP) i neurofibrilarne snopiće (neurofibrillary tangles-NFT) u prisutnim neuronima (slika 1.). Ovakve patološke lezije se mogu pronaći samo post mortem na histološkim preparatima moždanog tkiva i tek tada možemo sa sigurnošću postaviti definitivnu dijagnozu.



Slika 1. Prikaz patoloških lezija karakterističnih za Alzheimerovu demenciju; senilnih plakova i neurofibrilarnih snopića ( Malnar i Košiček, 2009)

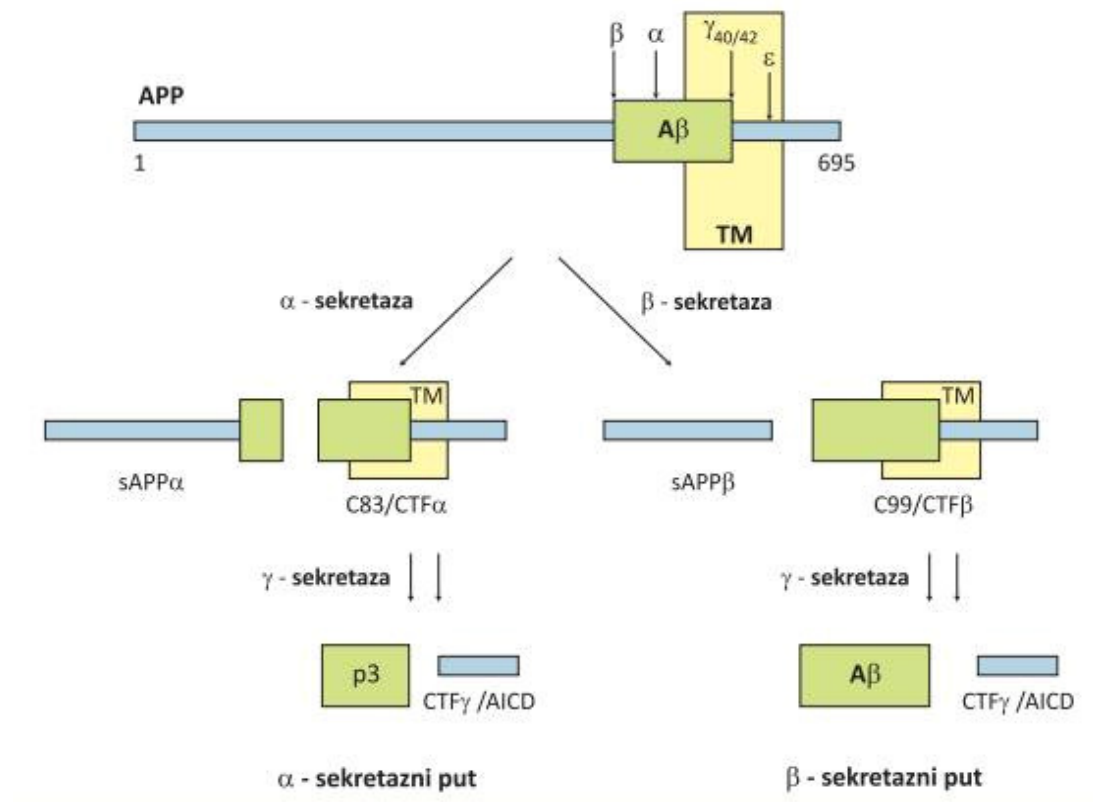


Alzheimerova demencija spada u skupinu neurodegenerativnih bolesti, karakterizirana je kao progresivna i ireverzibilna te dovodi do propadanja memorije i kognitivne funkcije. Najčešći je oblik demencije danas, te čini oko 60% svih slučajeva demencija. Procijenjeno je kako u svijetu danas ima 26 milijuna ljudi koji boluju od ove bolesti, 7.2 milijuna u Europi, 5 milijuna u Americi, 1,3 milijuna u Africi i 13.5 milijuna u Aziji. Pretpostavlja se da će se zbog sve dužeg životnog vijeka, svakih 20 godina broj oboljelih udvostručiti, te je tako 2040 predviđen 81 milijun oboljelih osoba ( Malnar i Košiček, 2009). Prevalencija demencija u osoba mlađih od 65 godina je manja od 1%. Prema genetičkoj podlozi možemo Alzheimerovu demenciju razvrstati na 2 oblika; nasljedni i sporadični. Nasljedni oblik bolesti se prenosi na autosomno dominantni način a prvi simptomi se javljaju prije 65 godine stoga se naziva rani oblik AD (early-onset Alzheimer's disease-EOAD). Prva otkrivena mutacija je bila ona u genu za prekursor proteina amiloid  $\beta$  (APP), dok su kasnije otkrivene i mutacije u genima za presenilin 1 i 2 (PSN 1 i 2). Otkriće u tim mutacijama značajno je doprinijelo razumijevanju molekularnog mehanizma AD. Sporadični oblik AD javlja se nakon 65 godine života te se još naziva kasni oblik (late-onset Alzheimer's disease LOAD). Sporadični oblik je ustvari češća varijanta Alzheimerove demencije. Mehanizam nastajanja ovog oblika nije još direktno povezan sa genetskim čimbenicima, već se smatra da je on posljedica djelovanja nekoliko gena i nekoliko čimbenika rizika. Jedini do sada utvrđeni čimbenik rizika je polimorfizam  $\epsilon 4$  u genu za apolipoprotein E (apoE). Funkcija apolipoproteina E je prijenos kolesterola u mozgu a  $\epsilon 4$  varijanta je najmanje učinkovita varijanta. U grupi AD taj polimorfizam prisutan je u čak 65%, dok se u homozigota rizik od oboljevanja povećava 15 puta ( Malnar i Košiček, 2009). Apolipoprotein E nije uzrok AD, već samo rizični čimbenik, ali je isto tako i rizični čimbenik za kardiovaskularne bolesti. Klinička slika same Alzheimerove demencije je nespecifična, pogotovo za ljude starije od 65 godina, stoga se najčešće dijagnosticira u stadiju kada već postoji značajna razina patologije u mozgu. Prvi simptomi se očituju pogoršanjem kognitivne funkcije te izražavanjem. Kako bi procijenili pacijentove kognitivne sposobnosti te postavili inicijalnu dijagnozu, danas se koriste različiti testovi koji imaju svoje mjerne skale. Simptomatologija AD je podijeljena u 3 stadija. Za prvi, rani stadij karakterističan je epizodni gubitak pamćenja, naročito usvajanja novog sadržaja što je praćeno i progresivnim propadanjem mogućnosti prisjećanja već usvojenih epizodičkih sadržaja. U drugom stadiju, jasno je izražena progresija demencije, te sve

više do izražaja dolaze afazija, apraksija i agnozija. Učenje, prepoznavanje najbliže rodbine te semantičko pamćenje, postaju sve slabiji, dok pamćenje davnih događaja ne mora biti u potpunosti izgubljeno. Treći stadij podrazumijeva gubitak deklarativnog pamćenja te svakodnevne aktivnosti postaju nemoguće jer bolesnik ne može žvakati, gutati, hodati te postaje potpuno ovisan o skrbi drugih. Sam mehanizam nastanka AD nije konačno utvrđen. Postoje razne hipoteze koje se smatraju bitnima za razvoj AD, koje uključuju razne mehanizme kao što su oksidativni stres, upalni procesi, sinaptička disfunkcija itd. Hipoteza amiloidne kaskade je uzeta kao najvjerojatiji put nastanka AD(<http://dementia.hiim.hr/2006%20Demencije.pdf>).

### **1.2.1. Hipoteza amiloidne kaskade**

Ona pretpostavlja da promjene u metabolizmu/razgradnji proteina amiloid  $\beta$  ( $A\beta$ ) dovode do kompleksnog niza događaja koji u konačnici dovode do neurodegeneracije i AD. Prekursor protein amiloid  $\beta$  (APP) je integralni protein koji se sastoji od velike N terminalne izvanstanične domene i kratke C terminalne citoplazmatske domene te je prisutan u neuronima ali i drugim stanicama. Gen za APP se nalazi na 21 kromosomu te alternativnim izrezivanjem možemo dobiti dvije izoforme: izoforma od 695 aminokiselina koja je dominantna u neuronima i dvije izoforme (751 i 770 aminokiselina) koje su dominantne u ostalim tkivima. Postoje dva puta kidanja APP-a, amiloidogeni i neamiloidogeni put (slika 2). U amiloidogenom putu prvi korak je kidanje proteina  $\beta$  sekretazom koja stvara topljivi  $APP\beta$  koji se otpušta izvan stanice i C99 fragment koji je vezan za membranu. Drugi korak je djelovanje  $\gamma$  sekretaze koja stvara  $A\beta$  i APP unutarstaničnu domenu (AICD). Neamiloidogeni put se također odvija u 2 koraka, samo što je u prvom koraku enzim  $\alpha$  sekretaza koja stvara topljivi  $APP\alpha$  i C83 fragment koji podliježe daljnjem djelovanju  $\gamma$  sekretaze koja stvara AICD i p3 fragment.



Slika 2. Amiloidogeni (β-sekretazni) i neamiloidogeni (α-sekretazni) put kidanja APP proteina (Malnar i Košiček, 2009).

Aβ je peptid(4 kDA) koji se sastoji od 38-43 AK ovisno o mjestu djelovanja enzima te se pod fiziološkim uvjetima normalno stvara u stanici. Postoje dva najznačajnija oblika Aβ<sub>40</sub> (Aβ<sub>1-40</sub>) i Aβ<sub>42</sub> (Aβ<sub>1-42</sub>). U fiziološkim uvjetima u stanici dominira Aβ<sub>40</sub> te tako čini čak 90% ukupnog Aβ peptida, dok se Aβ<sub>42</sub> stvara ali u znatno manjim količinama. Zbog dodatne 2 hidrofobne AK Aβ<sub>42</sub> je skloniji agregaciji te je u patofiziološkim uvjetima kao što je AD on dominantniji oblik Aβ peptida, što rezultira njihovom prisutnošću u plakovima. U normalnim uvjetima, također dolazi do razgradnje Aβ i na taj način se uklanja iz stanice. Smatra se da je ta neravnoteža nastajanja i razgradnja Aβ peptida primarni uzrok AD. Ta hipoteza se potvrdila otkrićem da mutacijama u genu za APP i PSN dolazi do EOAD. Dokazano je da razina Aβ<sub>40</sub> i Aβ<sub>42</sub> peptida korelira sa opadanjem kognitivne funkcije te da je povećana kod ranije razvijene demencije (Amemori i sur., 2011). Dokazano je također da je u frontalnom korteksu razina Aβ povećana prije pojave patologije vezane uz tau protein, druge karakteristične pojave za AD. Time je potkrijepljena

teorija da prisutnost povećane razine A $\beta$  peptida inicijalizira proces koji dovodi do neurodegeneracije.

### **1.2.2. Tau protein**

Neurofibrilarni snopići sadrže fosforilirani oblik tau (tubulin associated unit) proteina, koji također ima svoju fiziološku ulogu. On se predominantno nalazi u aksonima, a njegova glavna funkcija je vezanje tubulina pri čemu omogućava sklapanje mikrotubula i održava njihovu stabilnost. On je dominantni MAP (microtubule associated protein) protein u mozgu, koji se pojavljuje u šest izoforma koje nastaju alternativnim izrezivanjem mRNA. Izoforme variraju po veličini, od 352 do 441 AK. Tau protein se sastoji od 2 glavne funkcionalne domene; na C-kraju se nalazi domena koja veže mikrotubule i domena na N-kraju (acidic projection domain). Izoforme se pak razlikuju po prisutnosti tj. odsutnosti 1 ili 2 inserta od 29 AK koji su kodirani eksonima 2 i 3 u N-terminalnom dijelu, u kombinaciji sa 3 ili 4 ponavljajuće regije na C-terminalnom dijelu (Šimić i sur., 2016). Tijekom razvoja sisavaca (fetalni period) dominira oblik u kojem se 3 puta ponavlja motiv domene koja veže tubulin (R) te se on teško fosforilira. Funkcija povećane fosforilacije se smatra povezanom sa sinaptičkom aktivnošću. Sa starenjem mozga, dolazi do izjednačavanja omjera 4R i 3R tau (1:1) i ekspresije svih izoformi tau proteina te opadanja fosforilacije što možemo povezati sa smanjenom sinaptičkom aktivnošću kod starijih osoba (Khan i Bloom, 2016). Odstupanje od takvog omjera ponavljajućih domena može dovesti do taupatija koja se ne javlja samo u AD, već i u drugim oblicima demencija ali i neurodegenerativnih bolesti. Fosforilacija je uz glikozilaciju, glavna post translacijska modifikacija tau proteina. Smatra se da se fosforilacijom mijenja oblik samog proteina te se regulira njegova biološka aktivnost, dok se glikozilacijom kontrolira stanična lokalizacija te degradacija proteina. Hiperfosforilacija tau proteina dovodi do njegove akumulacije, uzrokujući njegovo odvajanje od mikrotubula što ima za posljedicu destabilizaciju mikrotubula pa i njegovu razgradnju. Također, dolazi do nakupljanja samog hiperfosforiliranog tau proteina unutar stanice, kao i ostalih proteina vezanih uz mikrotubule. Posljedica svega toga je poremećen transport unutar aksona te naposljetku smetnje u sinaptičkoj funkciji. Ovakve patološke promjene kod bolesnika započinju puno ranije nego sami klinički simptomi koji mogu upućivati na dijagnozu AD. Iako se smatra da su senilni plakovi ono što ustvari započinje cijelu

patološku kaskadu, ipak su neurofibrilarni snopići, tj. njihova količina ono što korelira sa stadijem bolesti (Šimić i sur., 2016). Takva saznanja se koriste za dijagnozu same AD.

### 1.2.3. Biomarkeri AD

Glavne značajke idealnog biomarkera vezanog uz AD su osjetljivost (vjerojatnost AD detekcije) i specifičnost (diferencijacija bolesnika s AD od zdrave populacije i bolesnika koji boluju od demencija drugog uzroka) iznad 85%. Karakteristike biomarkera koje se smatraju povoljnima su dostupnost, neinvazivna metoda, razumna cijena, specifičnost za patološku sliku te korelacija biomarkera sa progresijom bolesti (Šimić i sur., 2014).

Trenutno najreproducibilniji biomarkeri za rano otkrivanje AD su razine amiloid  $\beta$  peptida ( $A\beta_{1-42}$ ), ukupnog proteina tau (t-tau) te fosforiliranog oblika proteina tau (p-tau) u cerebrospinalnoj tekućini (CSF), tj. likvoru (tablica 1). Glavni nedostatak korištenja likvora u dijagnostičke svrhe je invazivna metoda uzimanja uzorka, lumbalna punkcija. Međutim, likvor nam daje bolju sliku o samoj patologiji mozga od krvijer je krv odvojena krvno-moždanom barijerom, dok je likvor u stalnom kontaktu s mozgom (Malnar i Košiček, 2009).

$A\beta$  peptid je glavna komponenta senilnih plakova, a najzastupljeniji oblici su  $A\beta_{1-42}$  i  $A\beta_{1-40}$  peptidi. Istraživanja likvora su pokazala da ne postoji statistički značajna razlika u količini ukupnog  $A\beta$  peptida između AD bolesnika i kontrola, dok je razina peptida  $A\beta_{1-42}$  značajno smanjena u likvoru AD bolesnika. To se objašnjava kao posljedica stvaranja plakova u mozgu i njegovog nakupljanja unutar njih, što smanjuje njegovu difuziju u likvor. Međutim, smanjena razina  $A\beta_{1-42}$  je opažena i u drugim bolestima poput Creutzfeldt-Jakobove bolesti, gdje ne dolazi do stvaranja plakova pa se smatra da postoje i drugi mehanizmi koji smanjuju razinu  $A\beta$  peptida: poput vezanja sa Apo-E i cistatinom C. CSF  $A\beta_{1-42}$  ima visoku osjetljivost (78-100%) ali nedovoljnu specifičnost (47-81%) u diferencijaciji bolesnika sa AD od zdravih kontrola. Primjećeno je također da se smanjenje razine  $A\beta$  događa puno prije pojavljivanja prvih simptoma. Ustanovljeno je da je omjer  $A\beta_{1-42}/A\beta_{1-40}$  precizniji biomarker AD.

Protein tau je unutarstanični protein koji se u likvoru nalazi kao posljedica lize, tj. smrti neurona. Ukupni tau (t-tau) nam govori o degeneraciji i smrti neurona, dok

fosforilirani tau (p-tau) ukazuje na fosforilaciju tau proteina i formiranje NFT-ova. U razlikovanju AD bolesnika od zdravih kontrola pokazalo se da p-tau ima bolju dijagnostičku specifičnost (92%) od t-tau (91%) te slabiju osjetljivost (80%) od t-tau (84%) (Šimić i sur., 2014). P-tau<sub>231</sub> se nalazi u korelaciji sa stvaranjem neurofibrilarnih snopića u mozgu, međutim p-tau<sub>181</sub> je onaj čija je razina povećana kod osoba oboljelih od AD u odnosu na zdrave kontrole ali njegova razina ne korelira sa stvaranjem neurofibrilarnih snopića.

Danas se u dijagnostičke svrhe najviše koriste omjeri t-tau/Aβ42 i p-tau/Aβ40. Studije su dokazale kako se omjer p-tau/Aβ42 može koristiti za razlikovanje bolesnika s AD od zdravih kontrola (osjetljivost 86%, specifičnost 96%) te za razlikovanje bolesnika s AD od bolesnika s drugim oblikom demencije (osjetljivost 80%, specifičnost 90%).

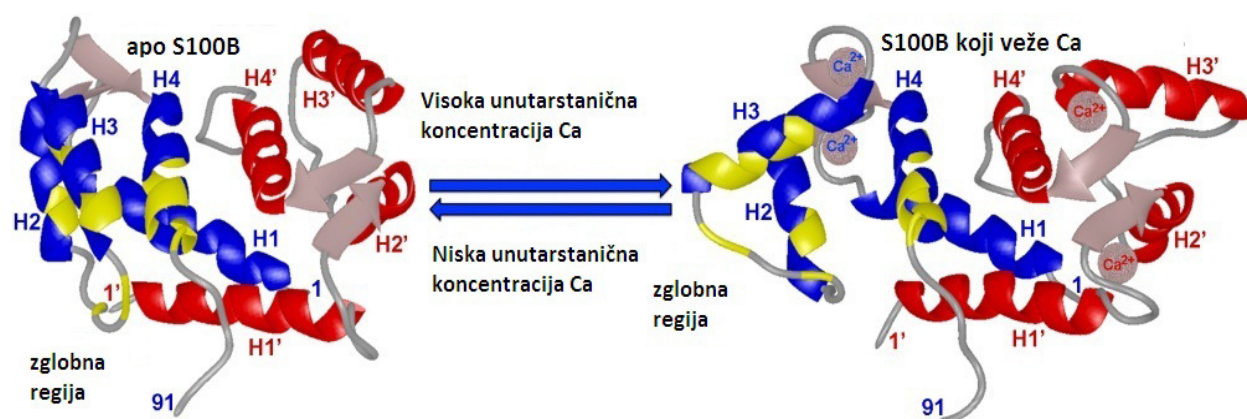
Tablica 1. Razina triju proteina (t-tau, p-tau i Aβ42) u likvoru pacijenata s različitim poremećajima izmjerenih metodom ELISA, Innogenetics (Malnar i Košiček, 2009)

|                                  | t-tau                                 | P-tau  | Aβ42                           |
|----------------------------------|---------------------------------------|--|--------------------------------|
| Alzheimerova bolest              | umjereno do značajno povećanje        | umjereno do značajno povećanje                         | umjereno do značajno smanjenje |
| Starenje                         | normalno                              | normalno   | normalno                       |
| Depresija                        | normalno                              | normalno   | normalno                       |
| Parkinsonova bolest              | normalno                              | normalno   | normalno                       |
| Alkoholna demencija              | normalno                              | normalno   | normalno                       |
| Frontotemporalna demencija       | normalno do blago povećanje           | normalno do blago sniženje                             | normalno do blago povećanje    |
| Demencija s Lewyjevim tjeleščima | normalno do blago povećanje           | normalno   | blago do umjereno povećanje    |
| Creutzfeld-Jacobova bolest       | izrazito povećanje                    | normalno, u nekim slučajevima blago/umjereno povećanje | umjereno do značajno smanjenje |
| Akutni infarkt                   | povećanje korelira s jačinom infarkta | bez promjene   | bez promjene                   |
| Vaskularna demencija             | kontradiktorni rezultati              | normalno   | normalno do blago povećanje    |

### 1.3. S100

Grupa proteina S100 su kiseli proteini niske molekularne mase (10-12 kDa) koji su dio *EF-hand family* Ca-vezajućih proteina. *EF-hand* je najčešći Ca-vezajući motiv

koji se sastoji od 2  $\alpha$  heliksa koji su povezani kratkom petljom (obično oko 12 AK) koja najčešće veže Ca. Vezanje Ca potiče konformacijsku promjenu proteina, čime se stvara pukotina i omogućava reakciju sa odgovarajućom ciljnom molekulom (slika 3). Oni nemaju intrinzičku katalitičku aktivnost, već se smatraju Ca-senzornim proteinima. Proteini grupe S100 se tako zovu jer su topljivi u 100% zasićenoj otopini amonijevog sulfata u neutralnom pH (Sedaghat i Notopoulos, 2008). Svaki monomer S100 proteina sadrži 2 Ca-vezajuća motiva; jedan na bazičnom N kraju (14 AK) i jedan na kiselom C-kraju (12 AK). Dio koji povezuje ova dva konzervirana motiva se najviše razlikuje u sekvenci među S100 proteinima i tako omogućuje specifičnost pri reakciji sa ciljnim molekulama. Njihova struktura se sastoji od 2 zasebne EFstrukturne domene, 4 $\alpha$  heliksa, centralne varijabilne regije te varijabilne domene na C i N kraju. Istraživanja su pokazala da samo *Ef*domenana C-kraju prolazi kroz konformacijske promjene uslijed vezanja  $Ca^{2+}$  te da EF domena na N kraju ne podliježe Ca-ovisnim konformacijskim promjenama (McClintock i Shaw, 2003).



Slika 3. Konformacija i struktura S100 proteina bez i sa vezanjem Ca (preuzeto sa [www.gopixic.com](http://www.gopixic.com) )

S100B je homodimer koji se sastoji od S100 $\beta$  monomera (91 AK) kojeg možemo pronaći u glija stanicama centralnog živčanog sustava (astrociti) i perifernog živčanog sustava ali i u adipocitima, melanocitima i hondrocitima. Kodiran je S100B genom koji se nalazi na kromosomu 21q22.3 (Sedaghat i Notopoulos, 2008). Protein S100B ima unutarstaničnu i izvanstaničnu ulogu. Unutar stanice reagira sa elementima citoskeleta (mikrotubuli), sa enzimima koji su uključeni u glikolitički put (fosfoglukomutaza) i p53. Na jednom od primjera, vezanje S100B i tau proteina (inhibicija fosforilacije tau proteina protein kinazom II) koja je ovisna o vezanju Zn a

neovisna o vezanju Ca, pretpostavlja se mogućnost vezanja Zn ili Cu koji reguliraju biološku aktivnost proteina.

Osim njegove unutastančne funkcije, S100B može biti izlučen izvan stanice (astrocita) gdje se ponaša kao citokin. Izlučuje se kao odgovor na različite stimulanse kao što su metabolički stres, proinflamatorni citokini,  $\beta$ -amiloidni peptidi, povećana koncentracija  $Ca^{2+}$ . S100B može imati trofički ili toksični efekt ovisno o njegovoj koncentraciji. U niskoj nanomolarnoj fiziološkoj koncentraciji potiče rast neurona (inducira ekspresiju antiapoptotičkog faktora Bcl-2) te povećava njihovo preživljenje tijekom razvoja i ozljeda, dok s druge strane više, mikromolarne koncentracije proteina mogu imati toksični efekt i izazvati smrt neurona (inducira povećanu ekspresiju kaspaze 3 pomoću aktivacije MEK/ERK signalnih puteva koji su ovisni o oksidativnom stresu) (Leclerc i sur.,2010).

S100B se povezuje s patologijom mnogih bolesti. Tako je u nekim studijama dokazano da je njegova razina povišena kod pacijenata sa depresijom, pogotovo tijekom njihovih akutnih epizoda i tijekom epizoda poremećaja raspoloženja. Također, u neuropatološkoj studiji pronađeni su S100B imunopozitivni astrociti u većoj koncentraciji kod osoba sa depresijom i bipolarnim poremećajem (Kaya i sur., 2015). European society for Medical Oncology (ESMO) je zaključilo da je S100B najtočniji test u praćenju pacijenata oboljelih od melanoma (Lippi i Cervellin, 2016). Iz razloga njegove povećane razine kod osoba s melanomom, pretpostavljena je njegova povezanost sa progresijom tumora, zbog njegove interakcije sa tumor supresorom p53 koja onemogućava fosforilaciju p53 te tako i regulaciju staničnog ciklusa. S100B smanjuje ekspresiju proteina p53 u odgovoru na određene događaje u stanici, međutim p53 isto tako reducira ekspresiju S100B proteina. Lijek, pentamidin, koji blokira interakciju S100B i p53 dovodi do značajnog smanjenja rasta tumorskog tkiva (Donato i sur., 2010).

Povećana razina S100 nalazi se u krvi i likvoru kod traumatske ozljede mozga (TBI). Meta analiza 22 studije dovela je do zaključka da kod CT pozitivnih pacijenata sa srednjom TBI, on kao biomarker ima osjetljivost 98.7%, a specifičnost otprilike 51%. Daljnje smanjivanje graničnih vrijednosti na 0,20  $\mu$ g/L bi dovelo do identificiranja ozljede mozga sa 99.6%-tnom osjetljivošću i 47%-tnom specifičnošću. Pokazano je da bi visoka negativna prediktivna vrijednost S100B kod 50% pacijenata sa srednjom TBI mogla izbjeći CT mozga te tako smanjiti zdravstvene troškove pacijenta za otprilike 30%. No, isto tako razmatrajući ovakve informacije treba biti oprezan jer su

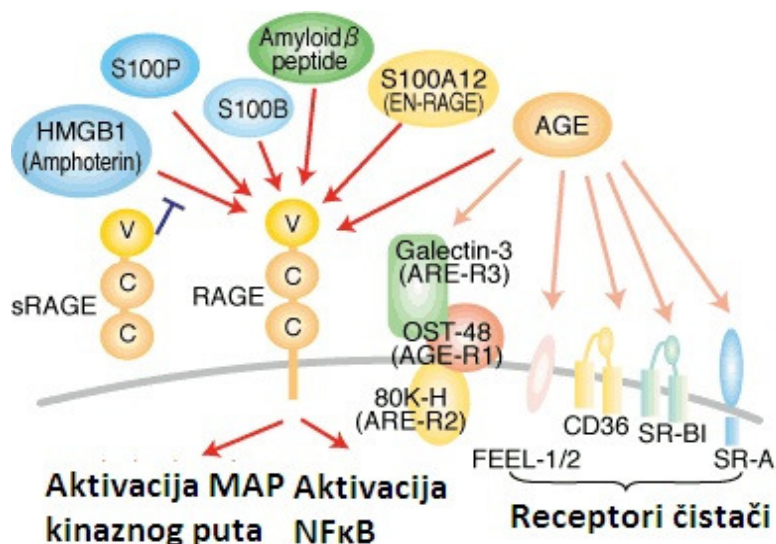


u različitim studijama gdje se pokušalo dokazati da S100B može izbaciti CT iz dijagnostičke primjene korištene različite granične vrijednosti (Lippi i Cervellin, 2016). Kod interpretacije rezultata mjerenja S100 u serumu treba biti vrlo oprezane samo zbog toga što može potjecati iz različitih tkiva a ne samo iz mozga, već i zbog njegovog kratkog poluvremena života (oko 30 min).

### **1.3.1. S100 i Alzheimerova demencija**

Aktivirana mikroglia je prisutna oko amiloidnih plakova te ona pretjerano eksprimira interleukin 1(IL-1),potentni citokin koji aktivira astrocite. Ovakva saznanja ukazuju na to da je u neuroinflamatornom procesu aktivacija astrocita IL-1 jedan od ranijih događaja neuroinflamatornog procesa,što naposljetku dovodi do razvijanja  $\beta$  amiloidnih plakova karakterističnih za AD. Aktivirani astrociti povezani s plakovima ekspimiraju povećanu razinu biološki aktivnog S100 $\beta$ .Ovo ukazuje na to da bi S100B mogao činiti patološku povezanost između povećane mikroglialne ekspresije IL-1 i stvaranja neurita u amiloidnim plakovima. To promiče zaključak da pojavi distrofičkih neurita u difuznim amiloidnim plakovima prethode aktivirani astrociti koji ekspimiraju S100B te da bi ekspresija S100B trebala korelirati sa količinom distrofičkih neurita u amiloidnim plakovima (Griffin i sur., 2013). U istraživanju na miševima nastalim križanjem Tg2576 miša (model AD) i TghuS100B miša(koji pretjerano eksprimira S100B) ispitivana je poveznica između te dvije patologije (Mori i sur., 2010). Kao zaključak se nametnulo mišljenje da proinflamatorni događaji u mozgu koji su povezani sa S100B aktiviranim glijalnim stanicama u blizini  $\beta$  amiloidnih plakova mogu dovesti do pogoršanja patologije AD,što je u skladu sa time da je kronična i produžena aktivacija glija stanica štetna za mozak.Glija stanesu glavne prirodene imunološke stanice u središnjem živčanom sustavu.Neravnoteža između njihove protektivne i destruktivne funkcije može imati veliki utjecaj na neurotoksičnost kod neurodegenerativnih bolesti. Smatra se da kod AD,astrociti i mikroglia koegzistiraju sa  $\beta$ amiloidnim plakovima te da ti isti plakovi privlače i aktiviraju mikrogliju koja luči IL-1,koji pak aktivira astrocite i potiče sintezu S100B. Ovaj „citokinski krug” potiče daljnje otpuštanje proinflamatornih citokina i reaktanata akutne faze iz mikroglia i astrocita. To uzrokuje otpuštanje oksidativnih radikala i dušikovog oksida te dovodi do daljnjeg pogoršanja neuroinflamatornih procesa pa na kraju i smrti neurona.Povezanost između stvaranja plakova i glioze u

patologiji je upitna. Postoje dokazi da amiloidoza potiče gliozu, što podupire činjenica da kod liječenja imunoterapijom, reduciranjem A $\beta$  plakova dolazi do i do reduciranja astroglioze. No, drugi primjer nam ukazuje na obratnu situaciju u patologiji. Nesteroidni protuupalni lijekovi (NSAID) reduciraju broj aktiviranih glija stanica a različite epidemiološke studije su pokazale obrnuti odnos NSAID i AD. U studiji na miševima, promatrani su paralelno u dobi od 9 mjeseci Tg2576-huS100B miš (astrocitoza i amiloidoza) te Tg2576 miš (amiloidoza). Pokazano je da S100B inducirana gliozu dovodi do pogoršanja amiloidoze u mozgu, potvrđujući da je takav oblik glioze nepovoljan za patologiju AD (Mori i sur., 2010). Sve stanice koje okružuju senilne plakove (neuroni, mikroglia, endotelne stanice) eksprimiraju veću količinu receptora za glikacijske produkte (eng. receptor for advanced glycation endproducts, RAGE). RAGE je imunoglobulinu sličan stanični površinski receptor koji je na početku definiran kao receptor za *advanced glycation products* (AGE). AGE nastaju neenzimatskom modifikacijom proteina i lipida tako da se smanjuje broj ugljikohidrata, heterogeni su i najčešće se mogu naći na mjestima upale gdje služe kao okidač za RAGE-ovisan oksidativni stres i aktivaciju NF $\kappa$ B (slika 4). NF $\kappa$ B povećava ekspresiju RAGE receptora pa možemo uočiti pozitivnu povratnu spregu između aktivacije NF $\kappa$ B i RAGE receptora.



Slika 4. Učinci RAGE-a u stanici nakon vezanja liganada (preuzeto sa <http://ruo.mbl.co.jp/bio/e/product/metabolic/S100.html> )

RAGE ima razne ligande, veže i amiloidne proteine (A $\beta$  peptid), S100 proteine i amfoterin. Sam receptor ima različite izoforme, dvije koje prevladavaju: „*full-length*“ RAGE i *secreted isoform* (RAGE\_v1). „*Full-length*“ RAGE se sastoji od jedne varijabilne - like domene, dvije konstantne - like domene, kratke transmembranske domene i intracelularnog dijela koji je važan za prijenos signala unutar stanice. RAGE\_v1 ne posjeduje transmembransku domenu i intracelularni dio, on je topljivi i nalazi se u cirkulaciji te služi kao mamac za vezanje liganada RAGE-a. Zanimljivo je da je reducirana ekspresija topljive izoforme u neuronima hipokampusa pacijenata oboljelih od AD, što može navesti na zaključak da dolazi do aktivacije RAGE-a te da bi ovaj topljivi RAGE receptor ustvari mogao imati protektivan učinak kod AD time što sprječava transport A $\beta$  peptida kroz staničnu membranu neurona i krvno moždanu barijeru (Leclerc i sur., 2010). U fiziološkim uvjetima RAGE receptor je medijator transporta A $\beta$  peptida. S obzirom na temu ovog rada, nama je najzanimljivija interakcija S100B proteina i RAGE. S100B reagira sa varijabilnom domenom receptora i sumnja se da obuhvaća i multimerizaciju receptora. Pokazana je povećana osjetljivost neurona nakon infuzije A $\beta$  peptida u transgeničnog miša koji pretjerano eksprimira S100B tako potvrđujući da S100B ima ulogu u patogenezi AD (Leclerc i sur., 2010).

Osim uloge S100B u stvaranju amiloidnih plakova, pretpostavlja se njegoa uloga i u formiranju neurofibrilarnih snopića. Izvanstanični S100B promovira RAGE-ovisnu hiperfosforilaciju tau proteina putem modulacije JNK i Wnt singalnih puteva. Istraživanjem provedenim na neuralnim matičnim stanicama (NSC) dokazano je da S100B prekida Wnt signalni put tako što povećava ekspresiju glikoproteina Dickkopf-1 (DKK-1) koji aktivira GSK3 $\beta$  kinazu koja igra ključnu ulogu u taupatijama (Steardo i sur., 2008). Aktivacija Wnt signalnog puta vodi do dva glavna molekularna mehanizma: inhibicije GSK3 $\beta$  i akumulacije/degradacije  $\beta$ -katenina u citoplazmi. Put se aktivira putem membranskih receptora *Frizzleda* a može ga aktivirati 20-ak različitih liganada. GSK3 $\beta$  kinaza je dio multiproteinskog kompleksa čija je uloga dvostupanjska fosforilacija i posljedična razgradnja  $\beta$ -katenina putem ubikvitin-proteasomskog sustava (UPS). Inhibicijom GSK3 $\beta$  kinaze dolazi do stabilizacije  $\beta$ -katenina i njegovog gomilanja u staničnoj jezgri, stvaranja kompleksa sa transkripcijskim čimbenikom te pokretanje procesa transkripcije 20-ak različitih gena uključenih u procese staničnog razmnožavanja, apoptoze i metastaziranja.  $\beta$ -katenin direktno inhibira transkripcijski čimbenik NF $\kappa$ B čime se inhibira niz unutastaničnih

procesa vezanih uz apoptozu (Prejac, 2012). Već ranije je bilo poznato da u kortikalnim neuronima APP inducira ekspresiju DKK-1 koji negativno modulira Wnt signalni put te aktivira GSK3 $\beta$ , tau fosforilirajući enzim. DKK-1 je eksprimiran i u degenerativnim neuronima u AD i kolokalizira sa NFT. DKK-1 se ekspimirira u stanicama kao odgovor na stresne podražaje te povećava aktivnost GSK3 $\beta$  koji potiče hiperfosforilaciju tau proteina, formiranje NFT te neurodegeneraciju (Steardo i sur., 2008).

## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

Alzheimerova demencija je najčešća vrsta demencije te postaje sve veći svjetski zdravstveni problem. Definitivna dijagnoza same bolesti se može postaviti tek post mortem ali postoje određeni biomarkeri ( $\beta$ amiloid, t-tau, p-tau) koji koreliraju sa patološkim procesima u mozgu. Oni sami nisu dovoljno osjetljivi i specifični da bi razlikovali zdrave ispitanike od bolesnih pa se sve češće koriste njihovi omjeri.

S100B je protein koji se luči iz astrocita kao odgovor na različite podražaje. Ispoljava neke svoje učinke preko RAGE-a koji se povećano eksprimira u upalnim stanjima. U AD dolazi do neuroinflamatornog procesa, a oko amiloidnih plakova koji se stvaraju u AD utvrđeno je postojanje aktiviranih astrocita i mikroglije. Protein S100B se smatra mogućom poveznicom između glioze i amiloidoze.

Određivanjem koncentracije S100B proteina u likvoru pacijenata sa sumnjom na AD htjeli smo utvrditi da li je S100B potencijalni biomarker za rano otkrivanje AD u kombinaciji sa već poznatim biomarkerima.

### **3. MATERIJALI I METODE**

U ovom diplomskom radu analizirani su uzorci likvora u dvije skupine ispitanika. U prvoj skupini su bili ispitanici s kliničkom sumnjom na AD, a u drugoj skupini koja je predstavljala kontrolnu skupinu su bili ispitanici koji su podvrgnuti lumbalnoj punkciji radi isključenja neke neurološke bolesti. Ispitivanje je provedeno u uzorcima likvora preostalim nakon redovite bolničke i polikliničke obrade bolesnika.

#### **3.1. Ispitanici s AD**

Skupinu ispitanika činilo je 29 pacijenata s kliničkom sumnjom na AD, od toga 16 žena i 13 muškaraca, starosti 51-82 godine kojima su ranije određivani biljezi Alzheimerove demencije:  $A\beta_{1-42}$ , tau i p-tau<sub>181</sub>. Vrijednosti biljega su, uz anamnestičke podatke, bili glavni kriterij za odabir ispitanika. Kao pomoć u odabiru ispitanika korišten je kompjutorski program «Visualization of AD biomarkers» tvrtke INNOGENETICS® koji na temelju izmjerenih vrijednosti biomarkera procjenjuje vjerojatnost dijagnoze AD. Ispitanicima koji su prema procjeni razvrstani u kategoriju AD izmjeren je protein S100 u likvoru.

#### **3.2. Kontrolna skupina**

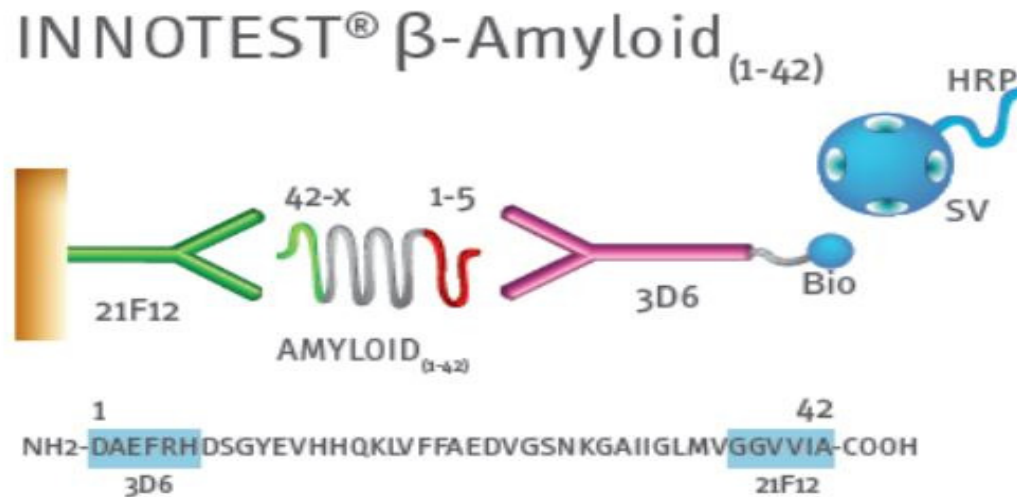
Kontrolnu skupinu je činilo 34 ispitanika (24 žene i 10 muškaraca, starosti 49-78 godina) bez kliničkih znakova demencije kojima je napravljena lumbalna punkcija radi isključenja neke neurološke bolesti. Svi ispitanici u kontrolnoj skupini su imali uredne citološke i biokemijske nalaze likvora.

### **3.3. METODE**

#### **3.3.1. Određivanje $A\beta_{1-42}$**

$A\beta_{1-42}$  određivan je enzimimunokemijskom metodom (ELISA) pomoću INNOTEST®  $\beta$ -AMYLOID<sub>(1-42)</sub> tvrtke INNOGENETICS® (slika 5). Monoklonalno antitijelo 21F12 (IgG2a) je vezano na čvrstu fazu, dodaju se uzorci likvora i inkubiraju. Ako u uzorcima postoji traženi antigen (u ovom slučaju  $A\beta_{(1-42)}$ ) doći će do specifičnog vezanja antigen-antitijelo. Nakon inkubacije i ispiranja dodaje se biotinirano antitijelo

3D6 (IgG2b). Komplex antitijelo-antigen-biotinirano antitijelo se detektira uz pomoć streptavidina obilježenog peroksidazom. Dolazi do interakcije biotin-streptavidin te nakon dodatka radne otopine supstrata za enzim, uzorci razvijaju boju. Intenzitet boje je mjera količine ljudskog A $\beta$ <sub>1-42</sub> u uzorku.



Slika 5. Princip metode za određivanje A $\beta$ <sub>(1-42)</sub> (preuzeto sa <https://www.fujirebio-europe.com/products-services/product-browser/innotestr-v-amyloid-1-42>)

#### Referentni intervali

| Dob(godine) | CSF A $\beta$ <sub>(1-42)</sub> (pg/mL) |
|-------------|---|
| 21-51       | 792±182                                 |
| 51-70       | 790±228                                 |
| >71         | 797±230                                 |

Specifikacije metode mogu se naći u insert package INX27271; 80324

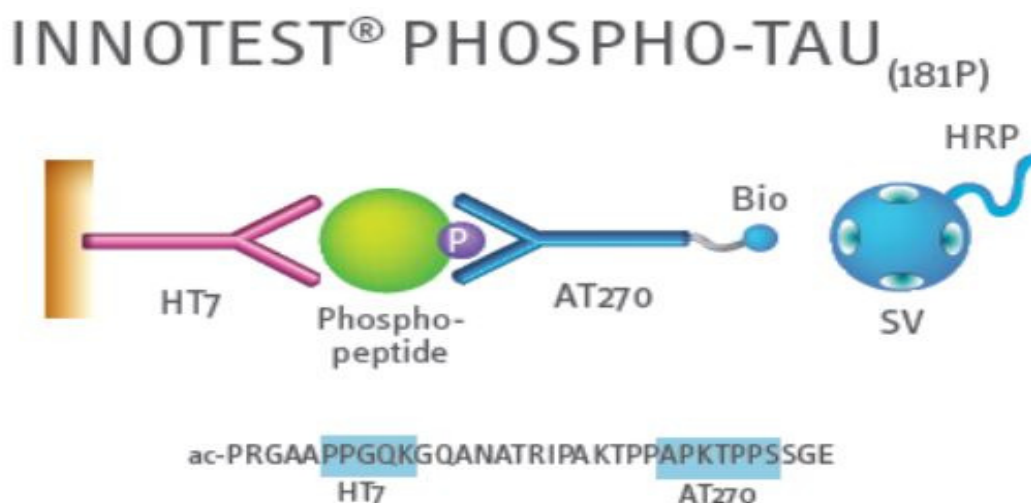
INNOTEST<sup>®</sup>  $\beta$ -AMYLOID<sub>(1-42)</sub>(6).

### 3.3.2. Određivanje p-tau<sub>(181p)</sub>

P-tau<sub>(181p)</sub> određivan je enzimimunokemijskom metodom (ELISA) pomoću INNOTEST<sup>®</sup> PHOSPHO-TAU<sub>(181P)</sub> tvrtke INNOGENETICS<sup>®</sup> (slika 6). Monoklonalno antitijelo HT7 (IgG1) je vezano na čvrstu fazu, dodaju se uzorci likvora i inkubiraju.

Ako u uzorcima postoji traženi antigen (u ovom slučaju p-tau<sub>(181)</sub>) doći će do specifičnog vezanja antigen-antitijelo. Nakon inkubacije i ispiranja dodaje se

biotinirano antitijelo AT270 (IgG1). Komplex antitijelo-antigen-biotinirano antitijelo se detektira uz pomoć streptavidina obilježenog peroksidazom. Dolazi do interakcije biotin-streptavidin te nakon dodatka radne otopine supstrata za enzim, uzorci razvijaju boju. Intenzitet boje je mjera količine fosforiliranog tau proteina u uzorku.



Slika 6. Princip metode određivanja P-tau<sub>(181p)</sub> (preuzeto sa <https://www.fujirebio-europe.com/products-services/product-browser/innotestr-phospho-tau181p-1> )

#### Referentni intervali

Intervali su izraženi u obliku medijana, dok je u zagradama naveden 25%-75% percentil.

| Dob(godine) | CSF Phospho-tau <sub>(181)</sub> (pg/mL) |
|-------------|--|
| 18-44       | 29.58(19.66-45.67)                       |
| 45-77       | 46.66(35.84-66.26)                       |

Specifikacije metode mogu se naći u insert package INX22652; 80317

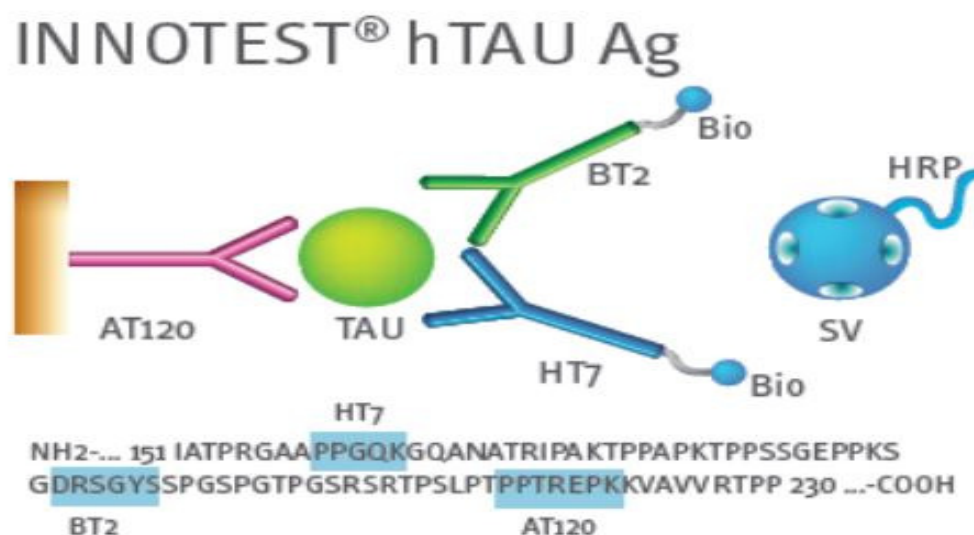
INNOTEST<sup>®</sup>PHOSPHO-TAU<sub>(181p)</sub>(5).

### 3.3.3. Određivanje (t-tau)

Ukupni tau protein određivan je enzimimunokemijskom metodom (ELISA) pomoću INNOTEST<sup>®</sup>hTAU Ag tvrtke INNOGENETICS<sup>®</sup> (slika 7). Monoklonalno antitijelo AT120 (IgG1) je vezano na čvrstu fazu, dodaju se uzorci likvora i inkubiraju. Ako u uzorcima postoji traženi antigen (u ovom slučaju t-tau) doći će do specifičnog vezanja antigen-antitijelo. Nakon inkubacije i ispiranja dodaju se biotinirana monoklonska



antitijela (HT7 i BT2; oba IgG1). Komplex antitijelo-antigen-biotinirano antitijelo se detektira uz pomoć streptavidina obilježenog peroksidazom. Dolazi do interakcije biotin-streptavidin te nakon dodatka radne otopine supstrata za enzim, uzorci razvijaju boju. Intenzitet boje je mjera količine ukupnog tau proteina u uzorku.



Slika 7. Princip metode određivanja hTAU Ag (preuzeto sa <https://www.fujirebio-europe.com/products-services/product-browser/innotestr-htau-ag-2>)

Bioški referentni intervali

| Dob(godine) | CSF Tau(pg/mL) |
|-------------|----------------|
| 21-51       | 136±89         |
| 51-70       | 243±127        |
| >71         | 341±171        |

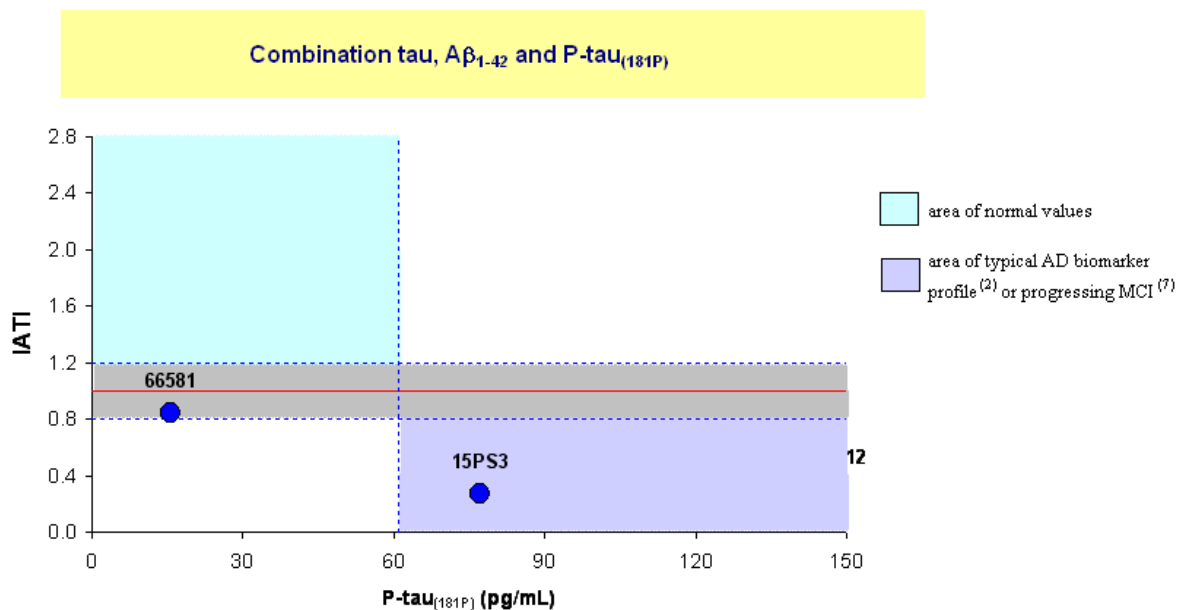
Specifikacije metode mogu se naći u insert package INX98924; 80323

INNOTEST®hTAU Ag (7).

### 3.3.4. Program «Visualization of AD biomarkers»

Nakon što su pacijentima određeni biljezi AD ( $A\beta_{1-42}$ , p-tau<sub>181</sub> i t-tau), njihove vrijednosti su upisivane u dijagram koji prikazuje ovisnost INNOTEST Amyloid Tau Indeks (IATI) o koncentraciji P-tau<sub>(181p)</sub> ( pg/ mL ) (slika 8). Vrijednost IATI je definirana kao koncentracija  $A\beta_{(1-42)}$  / (240+ (1.18x koncentracija t-tau)). Zdrava kontrola ima visoke vrijednosti  $A\beta_{(1-42)}$  i niske vrijednosti tau proteina, pa je IATI >1.

IATI=1 odgovara diskriminirajućoj liniji koja je izvedena iz multicentične studije. U njoj se pokušavala izračunati vrijednost te linije uzimajući u obzir najveću specifičnost za razlikovanje AD od zdravih kontrola (87%) i za razlikovanje AD od drugih neuroloških poremećaja (86%) sa osjetljivošću 85%. Osoba koja boluje od AD ima vrijednost IATI <1. Ovaj dijagram nam prikazuje vrijednosti sva 3 biomarkera, jer IATI smatramo zajedničkim indeksom za  $A\beta_{1-42}$  i t-tau te prikazom ovisnosti tog indeksa o koncentraciji p-tau<sub>181p</sub> možemo vizualizirati sva 3 biomarkera u jednom dijagramu.



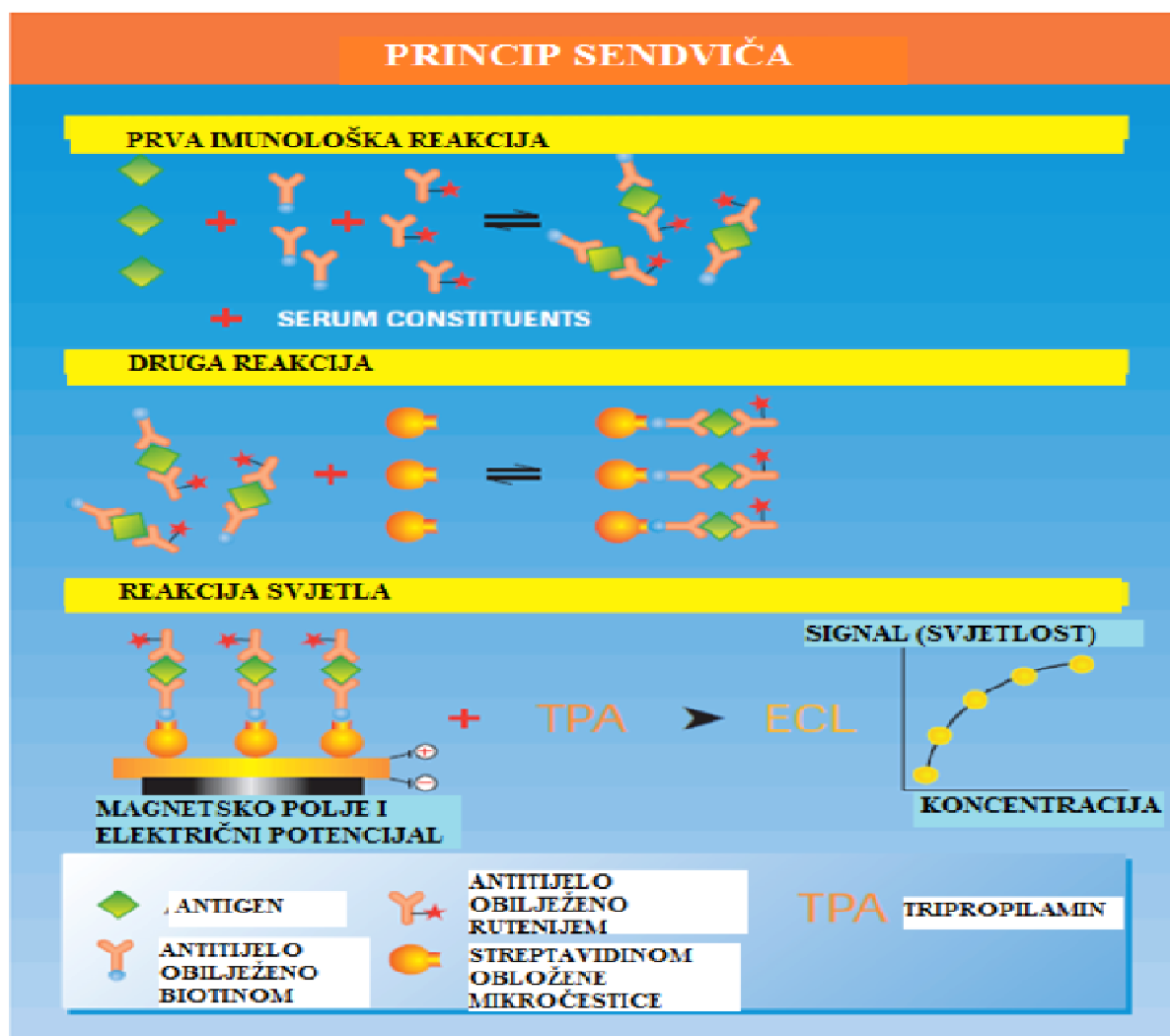
IATI (INNOTEST Amyloid Tau Index) is defined as  $A\beta_{1-42}/(240+1.18 \times \text{hT tau})$ .  
IATI = 1 corresponds to the red line in the upper chart.

Slika 8. Prikaz programa «Visualization of AD biomarkers». Dijagram prikazuje ovisnost Amyloid Tau Indeksa (IATI) o koncentraciji P-tau<sub>181p</sub> ( pg/ mL ). (slika preuzeta iz Instruction file «Visualization of AD biomarkers» )

### 3.3.5. Određivanje S100B

Protein S100B je određivan enzimimunokemijskom metodom koja koristi princip elektrokemiluminiscencije (ECLIA) (slika 9). Prvi korak je inkubiranje 20  $\mu\text{L}$  uzorka sa biotiniranim monoklinalnim S100-specifičnim antitijelom i monoklinalnim S100-specifičnim antitijelom obilježenim rutenijevim kompleksom. Ako je u uzorku prisutan antigen (u ovom slučaju S100B) dolazi do formiranja “sendvič” kompleksa. Drugi korak je inkubacija u kojoj se u reakcijsku smjesu dodaju mikročestice obložene streptavidinom te se tako stvoreni kompleks veže na čvrstu fazu putem

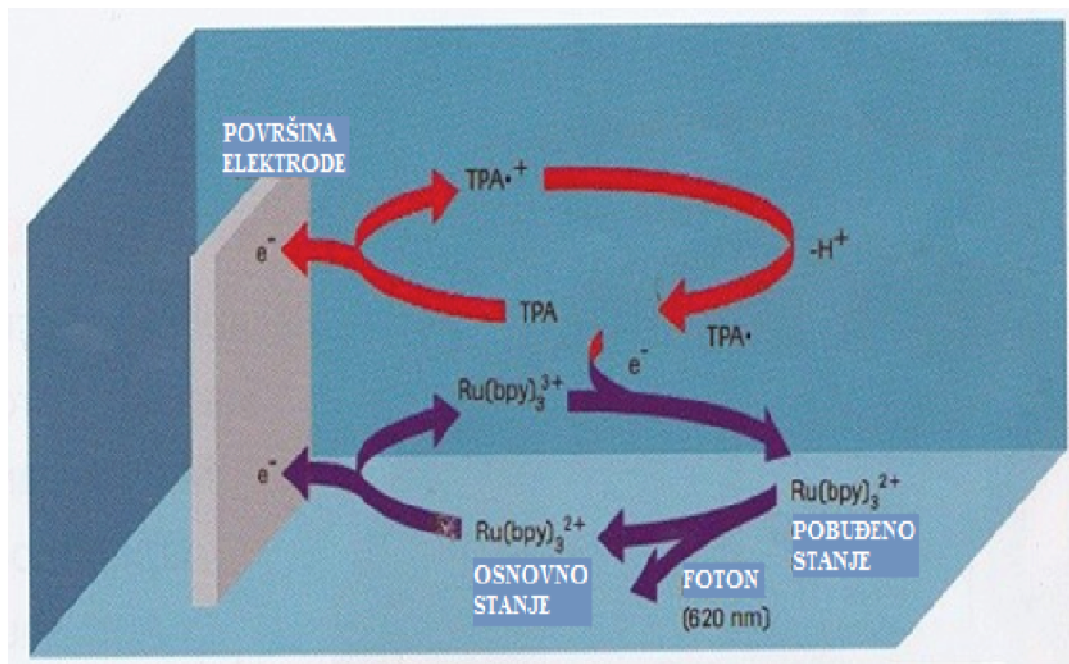
interakcije biotin-streptavidin. Reakcijska smjesa se usiše u mjernu komoru gdje se mikročestice magnetski hvataju na površinu elektrode. Nevezane supstance se uklanjaju otopinom Procell/Procell M koja sadrži TPA. Primjenom napona dolazi do reakcije između TPA i Ru-kompleksa pri čemu dolazi do emisije svjetla što se mjeri fotomultiplikatorom. Nastala količina svjetla je proporcionalna koncentraciji analita (S100B) u uzorku.



Slika 9. Princip metode ECLIA (preuzeto sa [www.hnlab.ir](http://www.hnlab.ir))

TPA i Ru-kompleks (Ru u obliku  $Ru^{2+}$ ) se oksidiraju na elektrodi (otpuštaju  $e^-$ ) te se stvaraju TPA radikal ( $TPA^{\cdot+}$ ) i kation  $Ru^{3+}$ . TPA radikal i Ru-kation reagiraju pri čemu se Ru-kompleks reducira i prelazi u pobuđeno stanje. Ono je nestabilno pa dolazi do emisije fotona na 620 nm i kompleks se vraća u osnovno stanje (slika 10). Reakcijski ciklus se nastavlja, TPA se troši pa njega treba biti u suvišku. Ru-

kompleks se konstantno regenerira te može proći kroz niz ciklusa u kojima se stvara svjetlosni signal.



Slika 10. Princip kemiluminescencije (preuzeto sa [www.hnlab.ir](http://www.hnlab.ir) )

#### SPECIFIKACIJE METODE

Analitička i funkcionalna osjetljivost

Donja granica detekcije predstavlja najnižu moguću vrijednost analita koja se može razlikovati od 0, što je u ovom slučaju  $<0,005 \mu\text{g/L}$ . Funkcionalna osjetljivost je najniža koncentracija analita koja može biti reproducibilno izmjerena sa intermedijarnom preciznošću CV 20%. Ona za S100 iznosi  $<0,02 \mu\text{g/L}$ .

Analitička specifičnost

Križna reaktivnost sa S100A1 ( $\alpha\alpha$ ) dimerom je nađena u  $<1\%$ .

Biološki referentni intervali za S100B u serumu

|        | Medijan( $\mu\text{g/L}$ ) | 95 percentil( $\mu\text{g/L}$ ) |
|--------|----------------------------|---------------------------------|
| Zdravi | 0,046                      | 0,105                           |

Specifikacije metode mogu se pronaći u insert package S100 cobas<sup>®</sup>03175243

190.(8)

#### 3.3.6. Statistička obrada

Rezultati su obrađeni u statističkom programu MedCalc v9.3.2.0.

## **4. REZULTATI I RASPRAVA**

### **4.1. REZULTATI**

Rezultati istraživanja prikazani su u tablici 2 (ispitanici s AD) i 3 (kontrolna skupina).

Tablica 2. Prikaz pacijenata sa vrijednostima S100B,  $\beta$ amiloida, p-tau, t-tau i omjera

| Redni broj | Prezime i ime | Godina rođenja | S100( $\mu$ g/L) | $\beta$ amiloid (pg/ml) | t-tau(pg/ml) | Omjer t-tau/A $\beta$ 42 | p-tau(pg/ml) | Omjer p-tau/A $\beta$ 42 |
|------------|---------------|----------------|------------------|-------------------------|--------------|--------------------------|--------------|--------------------------|
| 1          | Š.K.          | 1959           | 0,378            | 521                     | 1215         | 2,33                     | 123          | 0,24                     |
| 2          | Z.M.          | 1951           | 0,425            | 673                     | 1096         | 1,63                     | 119          | 0,18                     |
| 3          | H.V.          | 1953           | 0,395            | 614                     | 1333         | 2,17                     | 122          | 0,20                     |
| 4          | T.B.          | 1960           | 0,406            | 433                     | 884          | 2,04                     | 106          | 0,24                     |
| 5          | I.K.          | 1952           | 0,49             | 722                     | 649          | 0,90                     | 91           | 0,13                     |
| 6          | M.R.          | 1951           | 0,33             | 502                     | 608          | 1,21                     | 62           | 0,12                     |
| 7          | M.P.          | 1955           | 0,365            | 426                     | 785          | 1,84                     | 83           | 0,19                     |
| 8          | B.Ž.          | 1935           | 1,49             | 479                     | 532          | 1,11                     | 70           | 0,15                     |
| 9          | M.G.          | 1962           | 0,303            | 452                     | 1854         | 4,10                     | 150          | 0,33                     |
| 10         | L.R.          | 1965           | 0,532            | 718                     | 1441         | 2,01                     | 145          | 0,20                     |
| 11         | K.S.          | 1942           | 0,512            | 470                     | 619          | 1,32                     | 74           | 0,16                     |
| 12         | S.LJ.         | 1941           | 1,11             | 323                     | 1015         | 3,14                     | 105          | 0,33                     |
| 13         | Č.M.          | 1953           | 0,602            | 384                     | 1854         | 4,83                     | 142          | 0,37                     |
| 14         | P.I.          | 1943           | 0,417            | 464                     | 1662         | 3,58                     | 150          | 0,32                     |
| 15         | V.K.          | 1960           | 0,456            | 476                     | 1205         | 2,53                     | 124          | 0,26                     |
| 16         | O.M.          | 1941           | 0,475            | 513                     | 764          | 1,49                     | 61           | 0,12                     |
| 17         | K.J.          | 1934           | 0,532            | 671                     | 891          | 1,33                     | 62           | 0,09                     |
| 18         | M.S.          | 1942           | 0,361            | 471                     | 888          | 1,89                     | 99           | 0,21                     |
| 19         | K.S.          | 1960           | 0,402            | 529                     | 727          | 1,37                     | 82           | 0,16                     |
| 20         | A.E.          | 1940           | 0,67             | 600                     | 390          | 0,65                     | 60           | 0,1                      |
| 21         | G.E.          | 1944           | 0,318            | 472                     | 972          | 2,06                     | 116          | 0,25                     |
| 22         | V.Đ.          | 1944           | 0,261            | 610                     | 484          | 0,80                     | 62           | 0,10                     |
| 23         | C.Ž.          | 1935           | 0,396            | 645                     | 494          | 0,77                     | 74           | 0,11                     |
| 24         | M.K.          | 1952           | 0,404            | 369                     | 655          | 1,78                     | 89           | 0,24                     |
| 25         | G.Đ.          | 1936           | 0,41             | 526                     | 428          | 0,81                     | 67           | 0,13                     |
| 26         | H.M.          |                | 0,291            | 493                     | 468          | 0,95                     | 60           | 0,12                     |
| 27         | D.-L.J.       | 1950           | 0,79             | 763                     | 604          | 0,79                     | 85           | 0,11                     |
| 28         | P.M.          | 1952           | 0,728            | 618                     | 851          | 1,38                     | 100          | 0,16                     |
| 29         | K.I.          | 1948           | 0,838            | 497                     | 447          | 0,90                     | 62           | 0,12                     |

Tablica 3. Prikaz kontrola sa vrijednostima S100B ( $\mu\text{g/L}$ )

| Redni broj | Kontrola | S100 ( $\mu\text{g/L}$ ) |
|------------|----------|--------------------------|
| 1          | V.D.     | 0,615                    |
| 2          | Š.M.     | 0,935                    |
| 3          | T.P.     | 0,692                    |
| 4          | P.M.     | 0,812                    |
| 5          | P.D.     | 0,781                    |
| 6          | Š.M.     | 0,514                    |
| 7          | D.D.     | 0,808                    |
| 8          | F.A.     | 0,490                    |
| 9          | O.A.     | 0,518                    |
| 10         | S.M.     | 0,572                    |
| 11         | Š.-I. M. | 0,183                    |
| 12         | L.P.     | 0,461                    |
| 13         | Č.I.     | 0,611                    |
| 14         | T.S.     | 0,574                    |
| 15         | M.A.     | 0,448                    |
| 16         | I.B.     | 0,873                    |
| 17         | D.K.     | 0,662                    |
| 18         | Ć.C.T.   | 0,901                    |
| 19         | M.A.     | 0,951                    |
| 20         | R.S.     | 0,888                    |
| 21         | T.D.     | 0,658                    |
| 22         | B.M.     | 0,499                    |
| 23         | V.J.     | 0,836                    |
| 24         | B.I.     | 0,441                    |
| 25         | L.K.     | 0,523                    |
| 26         | L.J.     | 0,962                    |
| 27         | F.D.     | 0,674                    |
| 28         | M.R.     | 0,836                    |
| 29         | F.H.     | 0,905                    |
| 30         | D.I.     | 0,698                    |

|    |      |       |
|----|------|-------|
| 31 | A.R. | 0,875 |
| 32 | Š.M. | 0,768 |
| 33 | B.D. | 0,658 |

Podaci koje smo dobili Kolmogorov-Smirnovim testom slijede normalnu raspodjelu za sve parametre. Normalna raspodjela, naziva se još i Gaussova raspodjela, simetrična je te ima oblik zvona s većinom podataka smještenim u sredini krivulje. Dobiveni podaci za S100B su prikazani u tablici 4 i 5 (tablični prikaz).

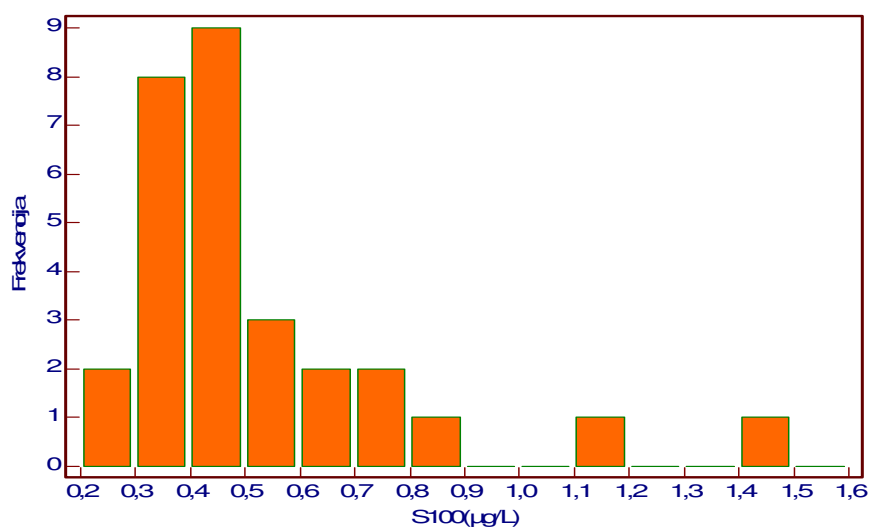
Tablica 4. Prikaz normalne raspodjele podataka za S100B u skupini ispitanika s AD (slika preuzeta iz statističkog programa Medcalc (omogućio KZLD))

| Varijabla  | S100B<br>S100B( $\mu\text{g/L}$ ) |                            |
|--|-----------------------------------|----------------------------|
| Veličina uzorka                                  |                                   | 29                         |
| Najniža vrijednost                               |                                   | 0,2610                     |
| Najveća vrijednost                               |                                   | 1,4900                     |
| Aritmetička sredina                              |                                   | 0,5202                     |
| 95% intervali pouzdanosti za aritmetičku sredinu |                                   | 0,4196 to 0,6209           |
| Medijan  |                                   | 0,4170                     |
| 95% intervali pouzdanosti za medijan             |                                   | 0,3948 to 0,5320           |
| Varijanca  |                                   | 0,06996                    |
| Standardna devijacija                            |                                   | 0,2645                     |
| Relativna standardna devijacija                  |                                   | 0,5084 (50,84%)            |
| Standardna pogreška aritmetičke sredine          |                                   | 0,04912                    |
| Skewnessov koeficijent                           |                                   | 2,2882 (P<0,0001)          |
| Kurtozijev koeficijent                           |                                   | 6,0428 (P=0,0009)          |
| Kolmogorov-Smirnov test za normalnu distribuciju |                                   | accept Normality (P=0,058) |
| Percentili                                       |                                   | 95% intervali pouzdanosti  |
| 2,5  | 0,2678                            |                            |
| 5  | 0,2895                            |                            |
| 10   | 0,3090                            |                            |
| 25   | 0,3748                            | 0,3056 to 0,4096           |
| 75   | 0,5495                            | 0,4281 to 0,8298           |
| 90   | 0,8188                            |                            |
| 95   | 1,1290                            |                            |
| 97,5   | 1,4045                            |                            |

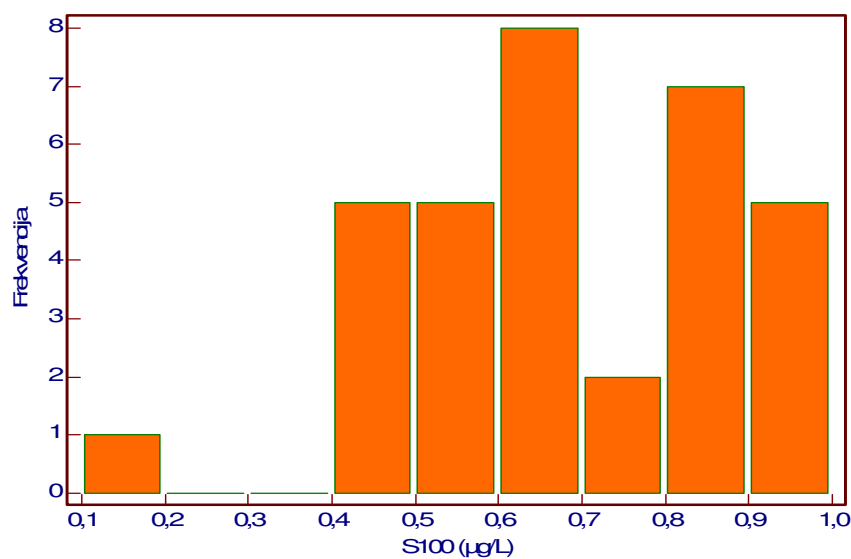


Tablica 5. Prikaz normalne raspodjele podataka za S100B u kontrolnoj skupini (slika preuzeta iz statističkog programa MedCalc (omogućio KZLD))

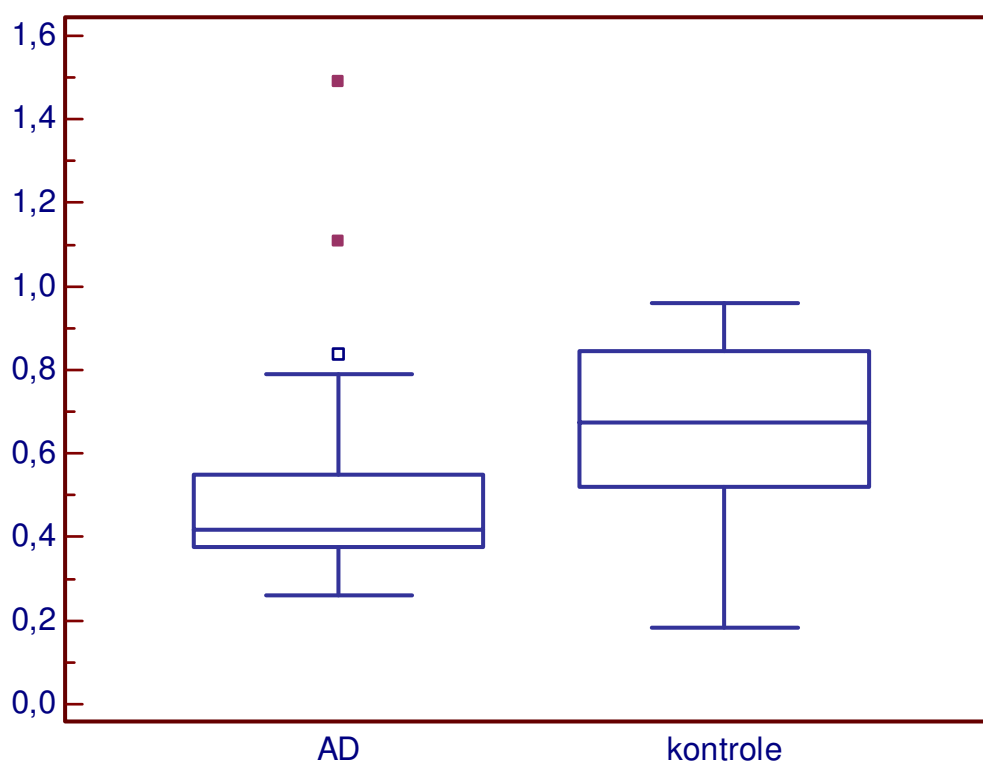
| Veličina uzorka                                  | 33                         |                  |
|--|----------------------------|------------------|
| Najniža vrijednost                               | 0,1830                     |                  |
| Najveća vrijednost                               | 0,9620                     |                  |
| Aritmetička sredina                              | 0,6855                     |                  |
| 95% intervali pouzdanosti za aritmetičku sredinu | 0,6191 to 0,7519           |                  |
| Medijan  | 0,6740                     |                  |
| 95% intervali pouzdanosti za medijan             | 0,5732 to 0,8212           |                  |
| Varijanca  | 0,03507                    |                  |
| Standardna devijacija                            | 0,1873                     |                  |
| Relativna standardna devijacija                  | 0,2732 (27,32%)            |                  |
| Standardna pogreška aritmetičke sredine          | 0,0326                     |                  |
| Skewnessov koeficijent                           | -0,4464 (P=0,2585)         |                  |
| Kurtozijev koeficijent                           | -0,1320 (P=0,6868)         |                  |
| Kolmogorov-Smirnov test za normalnu distribuciju | accept Normality (P=0,822) |                  |
| Percentili                                       | 95% Intervali pouzdanosti  |                  |
| 2,5  | 0,2668                     |                  |
| 5  | 0,4421                     |                  |
| 10   | 0,4584                     |                  |
| 25   | 0,5217                     | 0,4590 to 0,6589 |
| 75   | 0,8453                     | 0,6967 to 0,9095 |
| 90   | 0,9110                     |                  |
| 95   | 0,9486                     |                  |
| 97,5   | 0,9584                     |                  |



Slika 11. Histogram frekvencija S100B kod ispitanika s AD (slika preuzeta iz MedCalca (omogućio KZLD))



Slika 12. Histogram frekvencija S100B u likvoru ispitanika kontrolne skupine (slika preuzeta iz MedCalca(omogućio KZLD))



Slika 13. Usporedba vrijednosti S100B u likvoru ispitanika s AD i kontrolnoj skupini (slika preuzeta iz MedCalca (omogućio KZLD)).

Pomoću t-testa usporedili smo vrijednosti S100B u likvoru bolesnika s AD i u kontrolnoj skupini i dobili smo statistički značajnu razliku u vrijednostima ( $P = 0,0057$ )

Tablica 6. Usporedba vrijednosti S100B u likvoru ispitanika s AD i kontrolnoj skupini (tablica preuzeta iz MedCalca(omogućio KZLD))

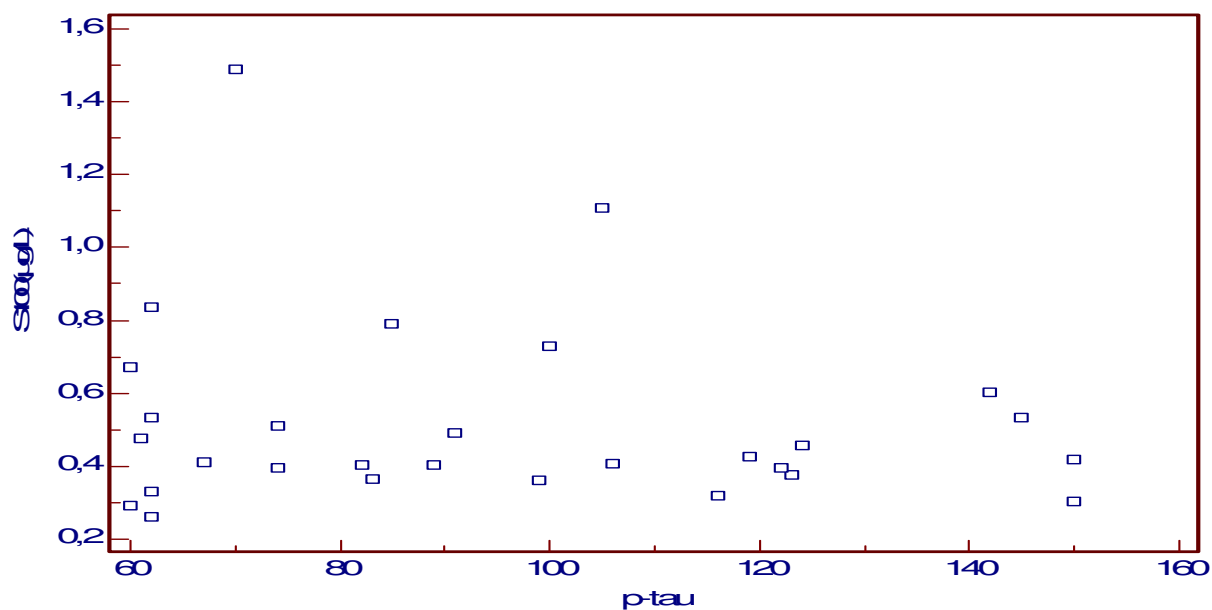
| Uzorak 1                                      | Ispitanici s AD   |                   |
|---|-------------------|-------------------|
| Uzorak 2                                      | Kontrolna skupina |                   |
|   | Uzorak 1          | Uzorak 2          |
| Veličina uzorka                               | 29                | 33                |
| Aritmetička sredina                           | 0,5202            | 0,6855            |
| 95% intervali pouzdanosti aritmetičke sredine | 0,4196 to 0,6209  | 0,6191 to 0,7519  |
| Varijanca                                     | 0,06996           | 0,03507           |
| Standardna devijacija                         | 0,2645            | 0,1873            |
| Standardna pogreška aritmetičke sredine       | 0,04912           | 0,0326            |
| F-test  |                   | $P = 0,061$       |
| <b>T-test</b>                                 |                   |                   |
| Razlika                                       |                   | 0,1653            |
| Standardna pogreška                           |                   | 0,05768           |
| 95% intervali pouzdanosti za razliku          |                   | 0,04989 to 0,2807 |
| Test statistič t                              |                   | 2,865             |
| Stupnjevi slobode (DF)                        |                   | 60                |
| Značajnost                                    |                   | $P = 0,0057$      |

Kod ispitanika s AD smo napravili korelaciju vrijednosti S100 sa vrijednostima pojedinačnih biljega i njihovih omjera ( $t\text{-tau}/A\beta_{42}$  i  $p\text{-tau}/A\beta_{42}$ ) kako bi vidjeli da li postoji statistički značajna korelacija koja bi se mogla upotrijebiti u dijagnostičke svrhe.

#### 4.1.1. Korelacija S100B i p-tau

Tablica 7. Prikaz statističkih parametara korelacije između S100B i p-tau (slika preuzeta iz statističkog programa Medcalc (omogućio KZLD))

|   |                                   |
|---|-----------------------------------|
| Varijabla Y                             | S100B<br>S100B( $\mu\text{g/L}$ ) |
| Varijabla X                             | p_tau<br>p-tau( $\text{pg/mL}$ )  |
| Veličina uzorka                         | 29                                |
| Spearmanov koeficijent korelacije (rho) | -0,0384                           |
| Stupanj značajnosti                     | $P=0,8391$                        |
| 95% interval pouzdanosti za rho         | -0,399 to 0,333                   |

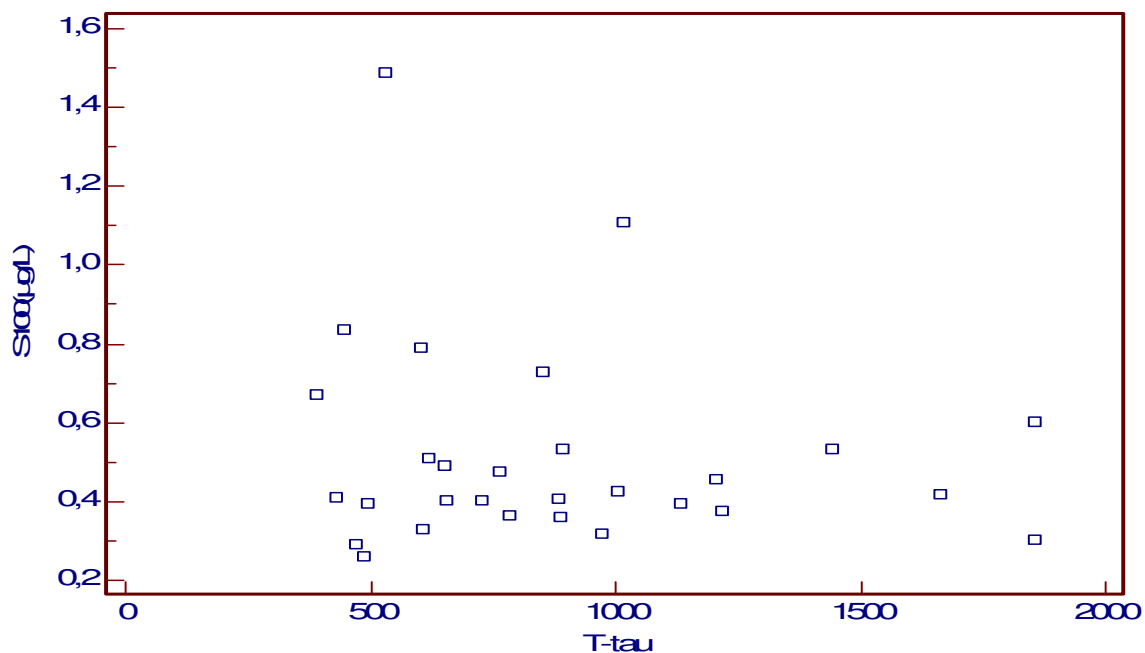


Slika 14. Scatter dijagram koji prikazuje korelaciju između S100B i p-tau (slika preuzeta iz statističkog programa Medcalc (omogućio KZLD))

#### 4.1.2. Korelacija između S100B i t-tau

Tablica 8. Prikaz statističkih parametara korelacije između S100B i t-tau (slika preuzeta iz statističkog programa Medcalc (omogućio KZLD))

|   |                                   |
|---|-----------------------------------|
| Varijabla Y                             | S100B<br>S100B( $\mu\text{g/L}$ ) |
| Varijabla X                             | T_tau<br>T-tau (pg/mL)            |
| Veličina uzorka                         | 29                                |
| Spearmanov koeficijent korelacije (rho) | -0,0594                           |
| Stupanj značajnosti                     | P=0,7534                          |
| 95% interval pouzdanosti za rho         | -0,417 to 0,314                   |

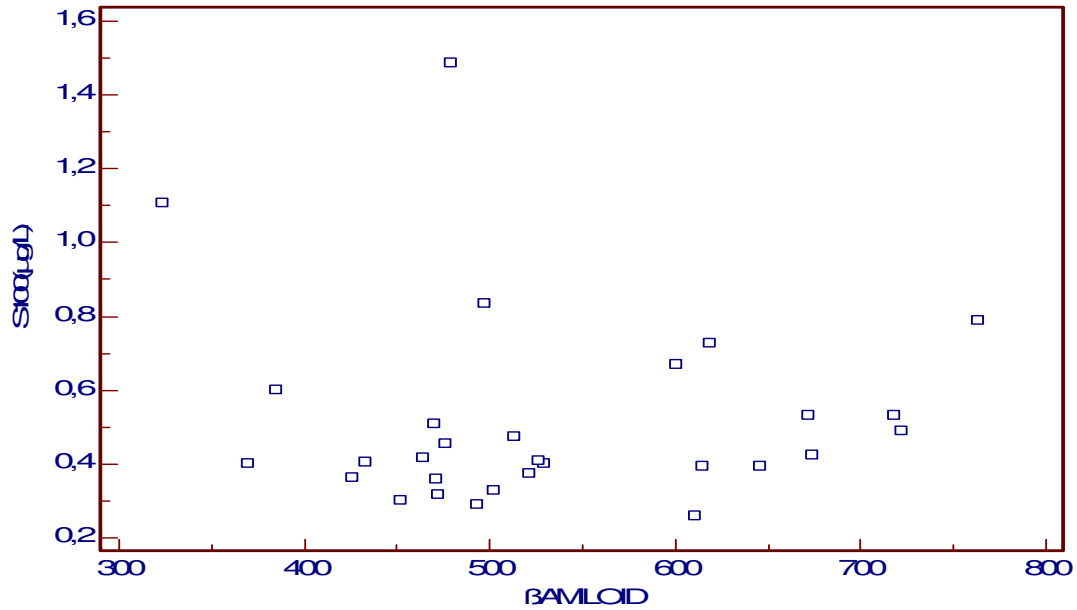


Slika 15. Scatter dijagram koji prikazuje korelaciju S100B i t-tau (slika preuzeta iz statističkog programa Medcalc (omogućio KZLD))

#### 4.1.3. Korelacija između S100B i $\beta$ -amiloida

Tablica 9. Prikaz statističkih parametara korelacije između S100B i  $\beta$  amiloida (slika preuzeta iz statističkog programa Medcalc (omogućio KZLD))

|   |                                   |
|---|-----------------------------------|
| Varijabla Y                             | S100B<br>S100B( $\mu\text{g/L}$ ) |
| Varijabla X                             | $\beta$ AMILOID (pg/mL)           |
| Veličina uzorka                         | 29                                |
| Spearmanov koeficijent korelacije (rho) | 0,147                             |
| Stupanj značajnosti                     | P=0,4357                          |
| 95% interval pouzdanosti za rho         | -0,232 to 0,488                   |

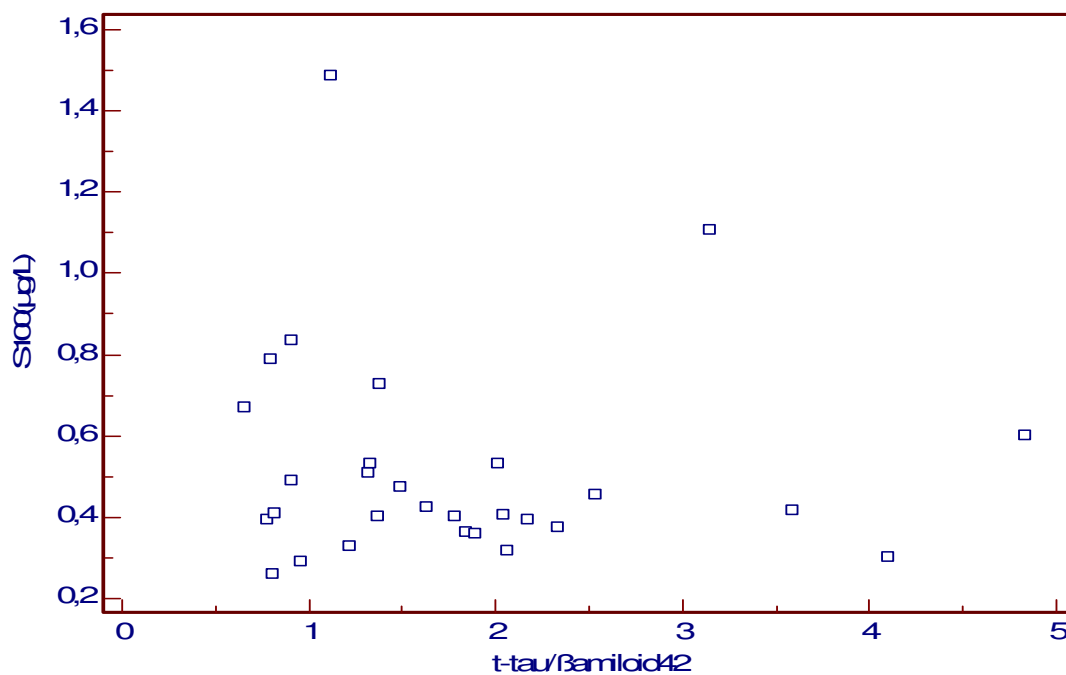


Slika 16. Scatter dijagram koji prikazuje korelaciju S100B i  $\beta$  amiloida (slika preuzeta iz statističkog programa Medcalc (omogućio KZLD))

#### 4.1.4. Korelacija između S100B i omjera t-tau/ $\beta$ amiloid42

Tablica 10. Prikaz statističkih parametara korelacije između S100B i omjera t-tau/  $\beta$ amiloid42 (slika preuzeta iz statističkog programa Medcalc (omogućio KZLD))

|  |  |
|--|--|
| Varijabla Y                                  | S100B<br>S100B( $\mu$ g/L)                           |
| Varijabla X                                  | t_tau_ $\beta$ amiloid42<br>t-tau/ $\beta$ amiloid42 |
| Veličina uzorka                              | 29   |
| Spearmanov koeficijent korelacije ( $\rho$ ) | -0,130   |
| Stupanj značajnosti                          | P=0,4929   |
| 95% interval pouzdanosti za $\rho$           | -0,474 to 0,249                                      |

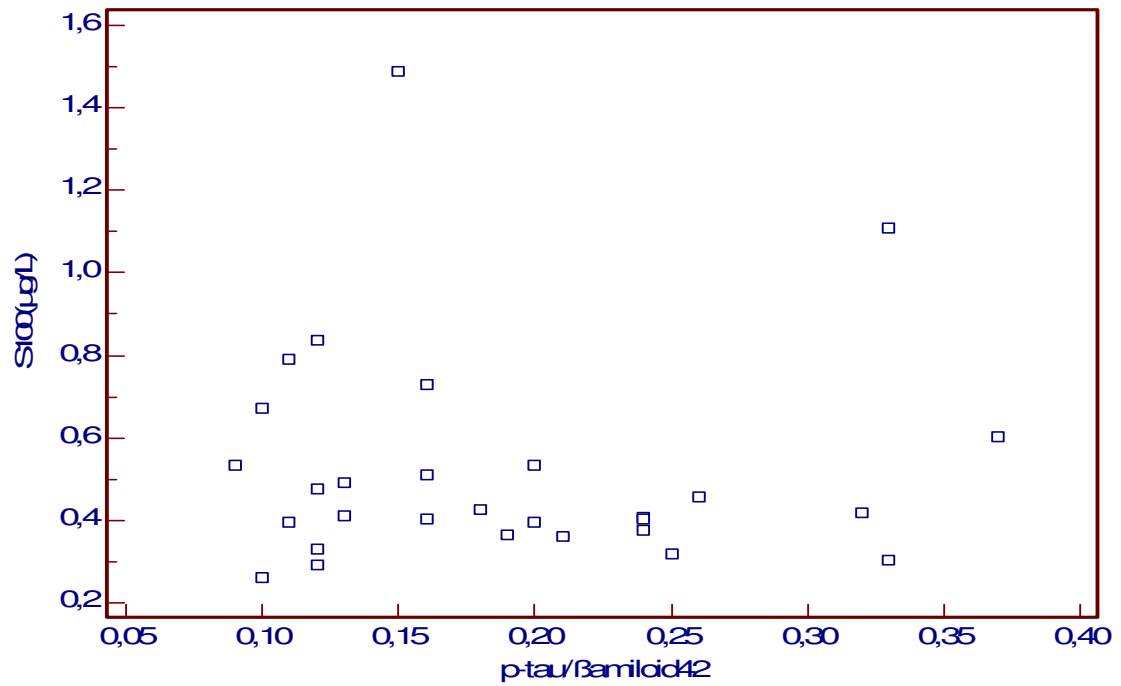


Slika 17. Scatter dijagram koji prikazuje korelaciju S100B i omjera t-tau/  $\beta$  amiloida (slika preuzeta iz statističkog programa Medcalc (omogućio KZLD))

#### 4.1.5. Korelacija između S100B i omjera p-tau/ $\beta$ amiloida42

Tablica 11. Prikaz statističkih parametara korelacije između S100B i omjera p-tau/  $\beta$ amiloid42 (slika preuzeta iz statističkog programa Medcalc (omogućio KZLD))

|   |  |
|---|--|
| Varijabla Y                                 | S100B<br>S100B( $\mu$ g/L)                   |
| Varijabla X                                 | p_tau_Bamiloid42<br>p-tau/ $\beta$ amiloid42 |
| Veličina uzorka                             | 29   |
| Spearmanov koeficijent korelacije( $\rho$ ) | -0,0962                                      |
| Stupanj značajnosti                         | P=0,6106                                     |
| 95% interval pouzdanosti za $\rho$          | -0,447 to 0,280                              |



Slika 18. Scatter dijagram koji prikazuje korelaciju S100B i omjera p-tau/  $\beta$  amiloida (slika preuzeta iz statističkog programa Medcalc (omogućio KZLD))



## 4.2. RASPRAVA

Razlikovanje Alzheimerove bolesti od drugih demencija nije jednostavno. Standardni neurološki testovi, detaljna anamneza te testovi procjene koji se koriste za razlikovanje AD od drugih demencija nisu dovoljni, pa se danas kod bolesnika sa sumnjom na AD u likvoru mjere biokemijski biljezi,  $\beta$ amiloid, tau protein i p-tau, te njihovi omjeri. Istovremeno su istraživanja usmjerena na pronalaženje novih potencijalnih biljega koji bi omogućili raniju dijagnostiku, ali i praćenje napredovanja bolesti.

U ovom radu je određivana koncentracija S100B proteina u likvoru kod bolesnika s AD s ciljem da se utvrdi da li je S100B potencijalni biomarker za rano otkrivanje AD u kombinaciji sa već poznatim biomarkerima te da li se S100B može koristiti u praćenju progresije bolesti.

Istraživanje je provedeno na dvije skupine ispitanika, u skupini bolesnika s AD i kontrolnoj skupini. U obje ispitivane skupine smo izmjerili koncentracije proteina S100 u likvoru metodom ECLIA, a u skupini bolesnika s AD smo dobivene vrijednosti usporedili s vrijednostima biljega koji se rutinski određuju u likvoru:  $\beta$ amiloida, tau proteina i p-tau proteina, te njihovih omjera kako bi procijenili ima li neki od ispitivanih parametara u kombinaciji sa S100 veći dijagnostički značaj.

Na slikama 11 i 12 su prikazane distribucije vrijednosti S100B u likvoru za ispitivane skupine. Za obje skupine ispitanika smo testirali razdiobu podataka (tablica 4 i tablica 5) i rezultati dobiveni Kolmogorov-Smirnovim testom su pokazali normalnu razdiobu podataka ( $p$  (kontrolna skupina) = 0,822,  $p$ (skupina s AD)= 0,058).  $P$  vrijednost nam govori o tome da li postoji statistički značajna razlika između izmjerene i očekivane vrijednosti. Normalna (Gaussova) razdioba je statistička raspodjela funkcije vjerojatnosti. Normalna raspodjela je zvonolika, simetrična s obzirom na aritmetičku sredinu te kontinuirana (Šimundić, 2006).

Usporedbom aritmetičkih sredina kontrolne skupine ( $\bar{x} = 0,69$ ) i skupine ispitanika s AD ( $\bar{x} = 0,52$ ), pomoću t-testa dobili smo statistički značajno niže vrijednosti S100B u likvoru u skupini bolesnika s AD u odnosu na kontrolnu skupinu ( $p=0,0057$ ). U literaturi se spominju različiti rezultati istraživanja (Chaves i sur., 2010), neki istraživači su dokazali veće vrijednosti kod skupine ispitanika s AD u odnosu na kontrolnu skupinu što se objašnjava astrogliozom koja prati AD. Druga skupina

istraživača nije dokazala statistički značajnu razliku između tih dviju skupina u vrijednostima S100B u likvoru (Chaves i sur., 2010). Izmjerene niže vrijednosti S100B u likvoru naših bolesnika mogu ukazivati na gubitak funkcijskih sposobnosti mozga kao posljedica neurodegeneracije (Chaves i sur., 2010) kod ispitivane skupine bolesnika s AD.

U drugom dijelu rezultata htjeli smo utvrditi da li postoji korelacija S100 sa pojedinačnim biljezima AD, ali i omjera p-tau/  $\beta$  amiloida, te t-tau/  $\beta$  amiloida. Korelacija je statistički postupak pomoću kojega ispituje povezanost dviju varijabli. Vrijednost korelacije se iskazuje koeficijentom korelacije, dok se značajnost koeficijenta iskazuje vrijednošću P. Budući je broj ispitanika u ovom radu bio relativno malen ( $N < 35$ ) u statističkoj obradi i analizi koristili smo Spearmanov koeficijent korelacije. U prikazu rezultata korelacija obvezno se navode koeficijenti povezanosti, brojem sa dva decimalna mjesta te značajnost koeficijenta korelacije P, brojem sa tri decimalna mjesta (tablica 7,8,9,10 i 11). Ako je vrijednost  $P > 0,05$ , bez obzira na vrijednost koeficijenta korelacije ne smijemo ga tumačiti te smatramo da on nije značajan. Ako je  $P < 0,05$  s obzirom na njegovu vrijednost zaključujemo je li značajan i prema tome ga tumačimo (Udovičić i sur., 2007).

U ovom istraživanju su za sve ispitivane parametre (tablice 7,8,9,10 i 11) vrijednosti značajnosti koeficijenta ( $P > 0,05$ ) što znači da koeficijenti korelacije nisu značajni te ne možemo tumačiti njihove vrijednosti. Ovim radom nije dokazana značajna korelacija proteina S100B u likvoru sa pojedinim biljezima Alzheimerove demencije (t-tau, p-tau,  $\beta$  amiloid). Premda su omjeri biljega (t-tau/  $\beta$  amiloid, p-tau/  $\beta$  amiloid) bolji biomarkeri jer imaju veću osjetljivost i specifičnost od pojedinačnih biljega AD, ovim istraživanjem, nije utvrđena značajna korelacija omjera biljega sa S100. Stoga ovi rezultati ne potvrđuju vrijednost određivanja proteina S100 u likvoru kao ranog biljega AD. Kako u literaturi nisu pronađeni podatci o ovakvim korelacijama, za bolju procjenu istraživanje bi trebalo provesti na većem broju ispitanika.

## 5. ZAKLJUČCI

1. U radu su dokazane statistički značajno snižene vrijednosti proteina S100B u likvoru ispitanika s AD u odnosu na kontrolnu skupinu.
2. Snižene vrijednosti S100B mogu ukazivati na loše funkcionalno stanje mozga u ispitivanoj skupini bolesnika.
3. Nije dokazana statistički značajna korelacija S100B sa pojedinačnim biljezima AD (t-tau, p-tau,  $\beta$  amiloid) niti sa omjerima (t-tau/  $\beta$  amiloid, p-tau/  $\beta$  amiloid).
4. Za procjenu S100B kao potencijalnog biljega progresije bolesti, ispitivanu skupinu bolesnika s AD bi trebalo pratiti tijekom dužeg vremenskog razdoblja i ponoviti mjerenja S100B

## 6. LITERATURA

1. Amemori, T., Jendelova, P., Ruzicka, J., Urdzikova, L. M., & Sykova, E. (2015). Alzheimer's disease: Mechanism and approach to cell therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(11), 26417–26451. <http://doi.org/10.3390/ijms161125961>
2. Chaves, M. L., Camozzato, A. L., Ferreira, E. D., Piazenski, I., Kochhann, R., Dall'Igna, O., ... Portela, L. V. (2010). Serum levels of S100B and NSE proteins in Alzheimer's disease patients. *Journal of Neuroinflammation*, 7, 6–12. <http://doi.org/10.1186/1742-2094-7-6>
3. Donato, R., Sorci, G., Bianchi, R., Riuzzi, F., Tubaro, C., Arcuri, C., & Giambanco, I. (2010). S100B protein, a damage-associated molecular pattern protein in the brain and heart, and beyond. *Cardiovascular Psychiatry and Neurology*. <http://doi.org/10.1155/2010/656481>
4. Esposito, G., Scuderi, C., Lu, J., Savani, C., De Filippis, D., Iuvone, T., ... Steardo, L. (2008). S100B induces tau protein hyperphosphorylation via Dickkopf-1 up-regulation and disrupts the Wnt pathway in human neural stem cells. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 12(3), 914–927. <http://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2008.00159.x>
5. Inset package INNOTEST<sup>®</sup>PHOSPHO-TAU<sub>(181P)</sub>; KEY CODE: INX22652 80317 INNOTEST<sup>®</sup>PHOSPHO-TAU<sub>(181P)</sub>;24898 v15; 08-08-2011
6. Inset package INNOTEST<sup>®</sup>β-AMYLOID<sub>(1-42)</sub>; KEY CODE: INX27271; 80324 INNOTEST<sup>®</sup>β-AMYLOID<sub>(1-42)</sub>; 25685 v17; 27-01-2011

7. Insert Package INNOTEST<sup>®</sup>hTAU Ag; KEY CODE: INX98924 ; 80323  
INNOTEST<sup>®</sup>hTAU Ag; 25684 v15; 21-01-2011
8. Insert Package S100 cobas<sup>®</sup>03175243 190 v.11 09-2015
9. Instruction file V1.0 „Visualization of AD biomarkers“ ; multiparametar approach with the INNOTEST<sup>™</sup> h TAU Ag, INNOTEST<sup>™</sup>β amyloid<sub>(1-42)</sub>i INNOTEST<sup>™</sup> phospho-tau<sub>(181)</sub>: What is it and how can I use it?
10. Kaya, B. C., Karadag, H., Oner, O., Kart, A., & Turkcapar, M. H. (2015). Serum S100B protein levels in patients with panic disorder: Effect of treatment with selective serotonin reuptake inhibitors. *Psychiatry Investigation*, 12(2), 260–262. <http://doi.org/10.4306/pi.2015.12.2.260>
11. Khan, S. S., & Bloom, G. S. (2016). Tau: The Center of a Signaling Nexus in Alzheimer’s Disease. *Frontiers in Neuroscience*, 10(FEB), 1–5. <http://doi.org/10.3389/fnins.2016.00031>
12. Leclerc, E., Sturchler, E., & Vetter, S. W. (2010). The S100B/RAGE axis in alzheimer’s disease. *Cardiovascular Psychiatry and Neurology*, 2010. <http://doi.org/10.1155/2010/539581>
13. Lippi, G., & Cervellin, G. (2016). Protein S100B: from cancer diagnostics to the evaluation of mild traumatic brain injury. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*, 54(5), 703–705. <http://doi.org/10.1515/cclm-2016-0144>
14. Malnar, M., Košiček, M., & Hećimović, S. (2009). Alzheimerova bolest : od molekularnog mehanizma do rane dijagnoze, Alzheimer ’ s disease : from molecular mechanism to early diagnosis, 45(3), 234–243.
15. McClintock, K. A., & Shaw, G. S. (2003). A novel S100 target conformation is revealed by the solution structure of the Ca<sup>2+</sup>-S100B-

- TRTK-12 complex. *Journal of Biological Chemistry*, 278(8), 6251–6257.  
<http://doi.org/10.1074/jbc.M210622200>
16. Mori, T., Koyama, N., Arendash, G. W., Horikoshi-Sakuraba, Y., Tan, J., Town, T. (2011). Overexpression of human S100B exacerbates cerebral amyloidosis and gliosis in Tg2576 Mouse model of Alzheimer's disease. *Glia*, 58(3), 300-314. <http://doi.org/10.1102/glia.20924>.
17. Mrazek, R. E., Sheng, J.G., Griffin W., S., T.(2013) Correlation of astrocytic S100 $\beta$  expression with dystrophic neurites in amyloid plaques of Alzheimer's disease. *J Neuropathol Exp. Neurol.*,55(3), 273-279
18. Prejac, J. (2012). Unutarstanični signalni putevi u karcinogenezi kolorektalnog tumora, Intracellular pathways in colorectal carcinogenesis, 25–34.
19. Santos, C. R. a, Cardoso, I., & Gonçalves, I. (2011). Key Enzymes and Proteins in Amyloid-Beta Production and Clearance. *Alzheimer's Disease Pathogenesis-Core Concepts, Shifting Paradigms and Therapeutic Targets*, (June), 53–86. <http://doi.org/10.5772/17646>
20. Sedaghat, F., & Notopoulos, a. (2008). S100 protein family and its application in clinical practice, 198–204.
21. Šimić, G., Babić, M., Mück-Šeler, D., Pivac, N., ŠvobŠtrac, D., Stanić, G., Hof, R., P. (2014) Update on the core and developing cerebrospinal fluid biomarkers for Alzheimer disease. *Croat Med J.* 55, 347-65.  
<http://doi.org/10.3325/cmj.2014.55.347>.
22. Šimić, G., Babić Leko, M., Wray, S., Harrington, C., Delalle, I., Jovanov-Milošević, N., ... Hof, P. R. (2016). Tau Protein Hyperphosphorylation and Aggregation in Alzheimer's Disease and Other Tauopathies, and Possible Neuroprotective Strategies. *Biomolecules*, 6(1), 6.  
<http://doi.org/10.3390/biom6010006>

23. Šimundić AM., (2006). Tipovi podataka i raspodjela. *Acta Med Croata* 2006; 60(Suppl.1):17-35
24. Trbojević - Čepe, M., Vogrinc, Ž., urednice / LIKVORSKA DIJAGNOSTIKA. (n.d.)
25. Udovičić M., Baždarić K., Bilić-Zulle L., Petrovečki M. (2007) Što treba znati kada izračunavamo koeficijent korelacije? *Biochemica Medica* 2007;17(1):10-5. <http://www.biochemia-medica.com/content/s-treba-znati-kada-izracunavamo-koeficijent-korelacije>
26. Uzun, S., Kozumplik, O., & Folnegovi, V. (2011). Alzheimer ' s Dementia : Current Data Review. *Collegium Antropologicum*, 35(4), 1333–1337. Retrieved from <http://hrcak.srce.hr/file/112422>
27. Neurobiologija demencija, 2006, <http://dementia.hiim.hr/2006%20Demencije.pdf> , pristupljeno 5.7.2016

## 7. SAŽETAK

Alzheimerova demencija (AD) je progresivna ireverzibilna bolest koja je najčešći oblik demencije danas. Mehanizam nastanka bolesti nije utvrđen, no po dosadašnjim saznanjima hipoteza amiloidne kaskade uzima se kao najvjerojatniji put nastanka AD. S100B je u literaturi povezan sa procesom neurodegeneracije, pa tako i AD. On se smatra poveznicom između amiloidoze i glioze, dva patološka procesa koji su prisutni u AD.

Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi da li se vrijednosti S100B u likvoru razlikuju u kontrolnoj skupini i skupini s AD te da li te vrijednosti koreliraju sa ostalim biljezima AD (t-tau, p-tau,  $\beta$  amiloid).

Istraživanje je provedeno na 2 skupine ispitanika, jedna je kontrolna dok su druga skupina bili ispitanici kojima vrijednosti biljega odgovaraju dijagnostičkim kriterijima za AD. U obje skupine, određivana je koncentracija S100B u likvoru elektrokemiluminescentnom metodom na analizatoru cobas 6000 cee (ECLIA, Roche Diagnostics). Rezultati su obrađeni u statističkom programu MedCalc v.9.3.2.0 (omogućio KZLD). Rezultati ukazuju na to da se vrijednosti u likvoru između ovih dviju skupina razlikuju. U literaturi su pronađene više vrijednosti kod ispitanika s AD nego u kontrolnoj skupini, dok smo mi dobili niže vrijednosti kod ispitanika s AD. Korelacija koja je napravljena sa pojedinačnim biljezima, te njihovim omjerima nije statistički značajna, međutim istraživanje bi trebalo biti provedeno na većem broju uzoraka kako bi to sa sigurnošću potvrdili.



## 8. SUMMARY

Alzheimer's dementia (AD) is a progressive irreversible disease and the most common type of dementia today. The mechanism of the occurrence has not been confirmed, but with the collected knowledge, the most probable way is amyloid cascade hypothesis. S100B is connected with the process of neurodegeneration, in literature. It is considered as a link between amyloidosis and gliosis, two pathological processes present in AD.

The main goal of this research is to determine if the value of S100B in cerebrospinal fluid differs in control group and group with AD and if those values correlate with the rest of the AD marks (t-tau, p-tau,  $\beta$ -amyloid).

The research has been conducted on 2 groups of respondents, one controlled, while the other one consisted of respondents whose characteristics match the diagnostic criteria for AD. In both groups, the concentration of S100B has been determined in cerebrospinal fluid with electromiluminscent method by cobas 6000 cee (ECLIA, Roche Diagnostics) analyzer. The results have been processed in the statistical program MedCalc v.9.3.2.0 (enabled by KZLD).

Results also show that the value in cerebrospinal fluid between the two groups differ. Higher values have been found with the respondents with AD than in the controlled group, in literature, while we established lower value with the respondents with AD. The correlation made with individual marks and with their ratios is not statistically significant, however a research should be made on a larger number of samples, so that a certain confirmation can be made.

## Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

S100B u Alzheimerovoj demenciji

Iva Đikić

### SAŽETAK

Alzheimerova demencija (AD) je progresivna ireverzibilna bolest koja je najčešći oblik demencije danas. Mehanizam nastanka bolesti nije utvrđen, no po dosadašnjim saznanjima hipoteza amiloidne kaskade uzima se kao najvjerojatniji put nastanka AD. S100B je u literaturi povezan sa procesom neurodegeneracije, pa tako i AD. On se smatra poveznicom između amiloidoze i glioze, dva patološka procesa koji su prisutni u AD.

Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi da li se vrijednosti S100B u likvoru razlikuju u kontrolnoj skupini i skupini s AD te da li te vrijednosti koreliraju sa ostalim biljezima AD (t-tau, p-tau,  $\beta$  amiloid).

Istraživanje je provedeno na 2 skupine ispitanika, jedna je kontrolna dok su druga skupina bili ispitanici kojima vrijednosti biljega odgovaraju dijagnostičkim kriterijima za AD. U obje skupine, određivana je koncentracija S100B u likvoru elektrokemiluminescentnom metodom na analizatoru cobas 6000 cee (ECLIA, Roche Diagnostics). Rezultati su obrađeni u statističkom programu MedCalc v.9.3.2.0 (omogućio KZLD).

Rezultati ukazuju na to da se vrijednosti u likvoru između ovih dviju skupina razlikuju. U literaturi su pronađene više vrijednosti kod ispitanika s AD nego u kontrolnoj skupini, dok smo mi dobili niže vrijednosti kod ispitanika s AD. Korelacija koja je napravljena sa pojedinačnim biljezima, te njihovim omjerima nije statistički značajna, međutim istraživanje bi trebalo biti provedeno na većem broju uzoraka kako bi to sa sigurnošću potvrdili.

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

Rad sadrži: 43 stranice, 18 grafičkih prikaza, 11 tablica i 27 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Alzheimerova demencija, S100, likvor

Mentor: **Dr. sc. Dunja Rogić**, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Željka Vogrinc**, *znanstvena suradnica, Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku, Klinički bolnički centar Zagreb*

**Dr. sc. Lidija Bach Rojceky**, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

**Dr. sc. Marija Miloš** *znanstvena suradnica, Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku, Klinički bolnički centar Zagreb*

Rad prihvaćen: srpanj 2016.

## Basic documentation card

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

Diploma thesis

S100B in Alzheimer s disease

Iva Đikić

### SUMMARY

Alzheimer's dementia (AD) is a progressive irreversible disease and the most common type of dementia today. The mechanism of the occurrence has not been confirmed, but with the collected knowledge, the most probable way is amyloid cascade hypothesis. S100B is connected with the process of neurodegeneration, in literature. It is considered as a link between amyloidosis and gliosis, two pathological processes present in AD. The main goal of this research is to determine if the value of S100B in cerebrospinal fluid differs in control group and group with AD and if those values correlate with the rest of the AD marks (t-tau, p-tau,  $\beta$ -amyloid). The research has been conducted on 2 groups of respondents, one controlled, while the other one consisted of respondents whose characteristics match the diagnostic criteria for AD. In both groups, the concentration of S100B has been determined in cerebrospinal fluid with electromiluminescent method by cobas 6000 cee (ECLIA, Roche Diagnostics) analyzer. The results have been processed in the statistical program MedCalc v.9.3.2.0(enabled by KZLD). Results also show that the value in cerebrospinal fluid between the two groups differ. Higher values have been found with the respondents with AD than in the controlled group, in literature, while we established lower value with the respondents with AD. The correlation made with individual marks and with their ratios is not statistically significant, however a research should be made on a larger number of samples, so that a certain confirmation can be made.

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

Thesis includes: 43 pages, 18 figures, 11 tables and 27 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Alzheimer's dementia, S100B , cerebrospinal fluid

Mentor: **Dunja Rogić, Ph.D.** Associate Professor University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Željka Vogrinc, Ph.D.** Assistant Research Scientist, Department of laboratory diagnostics, University Hospital Centre Zagreb  
**Lidija Bach Rojecky, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Marija Miloš, Ph.D.** Assistant Research Scientist, Department of laboratory diagnostics, University Hospital Centre Zagreb

The thesis was accepted: July 2016.

