

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Spomenka Kidemet-Piskač

**Vrednovanje određivanja ukupnih i
fosforiliranih tau proteina u likvoru radi
razlikovanja Alzheimerove bolesti i
vaskularne demencije**

DISERTACIJA

Zagreb, 2017.

Disertacija je izrađena u Hrvatskom institutu za istraživanje mozga Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Voditelj rada: prof. dr. sc. Goran Šimić

Zahvala

Zahvaljujem svom mentoru prof. dr. sc. Goranu Šimiću na velikoj podršci i stručnom vodstvu tijekom izrade ovog rada. Posebno hvala na savjetima, strpljenju i nesebično pruženom znanju koje me je osposobilo za daljnji znanstveni rad.

Veliko hvala dr. sc. Mirjani Babić Leko, mag. biol. mol. iz Hrvatskog instituta za istraživanje mozga na velikoj stručnoj pomoći i prijateljskoj podršci.

Hvala mojim roditeljima i bratu na podršci, ljubavi i ohrabrivanju.

Hvala i svim mojim prijateljima te kolegama na podršci i razumijevanju.

Na kraju, posebno hvala mom suprugu Marinu te djeci, Margareti i Dominiku na beskrajnom razumijevanju, podršci i ljubavi bez kojih ovaj rad ne bi bio moguć.

Sadržaj

1. UVOD I SVRHA RADA	1
1.1. Demencija	1
1.1.1. Povijest VaD	3
1.1.2. Kriteriji za dijagnozu VaD	3
1.1.3. Epidemiologija VaD.....	4
1.1.4. Patološke promjene kod VaD.....	4
1.1.5. Neurokemijske promjene kod VaD.....	7
1.1.6. Podjela VaD na temelju patoloških promjena.....	8
1.1.7. Podtipovi VaD ovisno o uzroku nastanka vaskularne lezije	10
1.1.8. Postavljanje dijagnoze VaD	13
1.2. Alzheimerova bolest	15
1.2.1. Patološke promjene kod AB.....	15
1.2.2. A β u AB.....	17
1.2.3. Hipoteza nastanka AB	17
1.2.4. Tau protein u AB	18
1.3. Biološki biljezi u dijagnostici demencija	20
1.3.1. Dijagnostički biljezi AB	20
1.3.2. Tau proteini u likvoru.....	21
1.3.3. Značaj bioloških biljega u diferencijalnoj dijagnostici AB i VaD	22
2. HIPOTEZA	23
3. CILJEVI RADA.....	24
3.1. Opći cilj.....	24
3.2. Specifični ciljevi	24
4. MATERIJALI I METODE	25

4.1.	Uključni i isključni kriteriji	25
4.2.	Korišteni ELISA testovi	27
5.	STATISTIČKA OBRADA PODATAKA	28
6.	REZULTATI	30
6.1.	Demografski podaci i vrijednosti ukupnog tau, p-tau181 i p-tau199 u likvoru oboljelih od AB, VaD, AB+VaD i zdravih kontrolnih ispitanika	30
6.2.	Usporedba vrijednosti ukupnog tau, p-tau181, p-tau199 između četiriju analiziranih skupina (AB, VaD, VaD+AB i KONT)	32
6.3.	Usporedba vrijednosti faktorskog skora (ukupni tau, p-tau181 i p-tau199) za skupine ispitanika s AB, VaD, VaD + AB te skupinu zdravih kontrolnih ispitanika. 42	
6.4.	Korelacije između bioloških biljega	44
6.5.	Osjetljivost i specifičnost ispitivanih bioloških biljega	52
6.6.	Biološki biljeg -tau231	65
6.6.1.	Usporedba vrijednosti p-tau231, FS (ukupni tau, p-tau181, p-tau199, p-tau231) i FS (MMSE i p-tau231) između bolesnika s AB, VaD, VaD + AB te zdravih kontrola	65
6.6.2.	Korelacija p-tau231 s ukupnim tau, p-tau181 i p-tau199	71
6.6.3.	Osjetljivost i specifičnost p-tau231, FS (ukupni tau, p-tau181, p-tau199, p-tau231) i FS (p-tau231 i MMSE)	76
6.6.4.	Analiza FS za p-tau231 i MMSE	82
7.	RASPRAVA	86
8.	ZAKLJUČCI	99
9.	SAŽETAK NA HRVATSKOM JEZIKU	102
10.	SUMMARY	103
11.	LITERATURA	104
12.	ŽIVOTOPIS	126

POPIS OZNAKA I KRATICA

AB	Alzheimerova bolest
A β	Beta-amiloid peptid
ACA	<i>Arteria cerebri anterior</i>
ACM	<i>Arteria cerebri media</i>
ACP	<i>Arteria cerebri posterior</i>
ADAS-Cog	<i>Alzheimer's Disease Assessment Scale-cognitive subscale</i>
AIDS	Stečeni sindrom imunodeficijencije (<i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i>)
ANOVA	Jednosmjerna analiza varijance
Apo E	Apolipoprotein E
APOE ϵ 4	Apolipoprotein E ϵ 4
APP	Prekursorni protein amiloida (<i>Amyloid Precursor Protein</i>)
AUC	Površina ispod krivulje (<i>Area Under the Curve</i>)
BALI	Indeks atrofije i oštećenja mozga (<i>Brain Atrophy and Lesion Index</i>)
BSLE	Binswanger subkortikalna leukoencefalopatija
CAA	Cerebralna amiloidna angiopatija
CADASIL	Cerebralna autosomno dominantna arteriopatija sa subkortikalnim infarktima i leukoencefalopatijom (<i>Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leucoencephalopathy</i>)
CJB	Creutzfeldt-Jakobova bolest
cAMP	ciklički adenzin monofosfat (<i>Cyclic adenosine monophosphate</i>)
CARASIL	Cerebralna autosomno recesivna arteriopatija sa subkortikalnim infarktima i leukoencefalopatijom (<i>Cerebral Autosomal Recessiv Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leucoencephalopathy</i>)
CDK5	ciklin ovisna kinaza 5 (<i>Cyclin dependent kinase 5</i>)
CDT	Test crtanja sata (<i>Clock-Drawing Test</i>)
CI	Interval pouzdanosti (<i>confidence interval</i>)
CRV	Cerebroretinalna vaskulopatija
CT	Kompjutorizirana tomografija
DLB	Demencija zbog nakupljana Lewyevih tjelešaca (<i>Dementia with Lewy Bodies</i>)
DN	Distrofični neurit (<i>Dystrophic neurite</i>)

DP	Senilni plakovi (<i>diffuse plaques</i>)
DSM-IV-TR	Dijagnostički i statistički priručnik mentalnih bolesti i poremećaja (<i>Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders</i>)
EFNS-ENS	Europska federacija neuroloških društava - Europsko neurološko društvo (<i>European Federation of Neurological Societies-European Neurological Society</i>)
ELISA	Enzimska imunoapsorpcijska analiza (<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>)
FS	Faktorski skor
FTD	Frontotemporalna demencija (<i>Frontotemporal Dementia</i>)
FTDP-17	Frontotemporalna demencija s parkinsonizmom zbog mutacije gena na 17. kromosomu (<i>Frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17</i>)
GSK-3 β	<i>Glycogen synthase kinase 3 beta</i>
HIS	Hatchinskijev ishemički skor (<i>Hatchinski ischaemic score</i>)
HERNS	Nasljedna endoteliopatija s retinopatijom, nefropatijom i moždanim udarom (<i>Hereditary endotheliopathy with retinopathy, nephropathy, and stroke</i>)
KONT	Zdravi kontrolni ispitanici
MAPT	Protein tau povezan s mikrotubulima (<i>Microtubule-Associated Protein Tau</i>)
MELAS	Mitohondrijalna encefalomiopatija, laktoacidoza i ponavljajuće epizode napadaja koje nalikuju moždanom udaru (<i>Mitochondrial Encephalomyopathy, Lactic Acidosis, and Stroke-like episodes</i>)
MKB	Međunarodna klasifikacija bolesti Svjetske zdravstvene organizacije
MoCA	Montrealska ljestvica procjene kognitivnih sposobnosti (<i>Montreal Cognitive Assessment</i>)
MR	Magnetska rezonancija (<i>Magnetic Resonance</i>)
MCI	Blagi kognitivni poremećaj (<i>Mild Cognitive Impairment</i>)
MMSE	Mala ljestvica kognitivnog stanja (<i>Mini-Mental State Examination</i>)
NFT	Neurofibrilarni snopići (<i>Neurofibrillary Tangles</i>)
NINCDS-ADRDA	Nacionalni institut za neurološke i komunikacijske poremećaje te moždani udar - Asocijacija za Alzheimerovu bolest i srodne poremećaje

(National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke – the Alzheimer's disease and Related Disorders Association)

NINDS-AIREN	Nacionalni institut za neurološke poremećaje i moždani udar - Međunarodna udruga za istraživanja i obrazovanje u neuroznanosti <i>(National Institute for Neurological Disorders and Stroke - Association Internationale pour la Recherche et l'Enseignement en Neurosciences)</i>
NFT	Neurofibrilarni snopići <i>(Neurofibrillary Tangles)</i>
NT	Neuropilne niti <i>(Neuropil Threads)</i>
NP	Neuritički plak
PCNSA	Primarni angiitis središnjeg živčanog sustava <i>(Primary Central Nervuos System Angiitis)</i>
PHF	Spareni uzvojniti filamenti <i>(Paired Helical Filaments)</i>
PP-1	Protein fosfataza 1 <i>(Protein phosphatase 1)</i>
PP-2A	Protein fosfataza 2A <i>(Protein phosphatase 2A)</i>
PSEN1	presenilin 1
PSEN2	presenilin 2
P-tau	Fosforilirani tau protein
P-tau181	Tau protein fosforiliran na treoninu 181
P-tau199	Tau protein fosforiliran na treoninu 199
P-tau231	Tau protein fosforiliran na treoninu 231
r	Spearmanov koeficijent korelacije
r _s	Pearsonov koeficijent korelacije
RNA	Ribonukleinska kiselina <i>(ribonucleic acid)</i>
mRNA	glasnička ribonukleinska kiselina <i>(messenger ribonucleic acid)</i>
tRNA	transportna ribonukleinska kiselina <i>(transfer ribonucleic acid)</i>
ROC krivulja	Krivulja osjetljivosti dijagnostičkog testa <i>(Receiver Operating Characteristic curve)</i>
S.A.D.	Sjedinjene Američke Države
Ser	aminokiselina serin <i>(Serine)</i>
VaD	Vaskularna demencija
VCI	Vaskularno kognitivno urušavanje <i>(Vascular Cognitive Impairment)</i>
T3	Trijodtironin
T4	Tiroksin
TMT	Test verbalne fluentnosti <i>(Trail Making Test)</i>

TSH Tiroidni stimulirajući hormon
Thr aminokiselina treonin (*Threonin*)

1. UVOD I SVRHA RADA

1.1. Demencija

Demenciju možemo definirati kao klinički sindrom koji se sastoji od gubitka epizodičkog deklarativnog pamćenja i oštećenja drugih spoznajnih sposobnosti, u osoba s minimalnim ili bez poremećaja svijesti, a koji se javlja radi kronične progresivne degenerativne bolesti mozga. Pojam uključuje brojne klinički slične slike karakterizirane ne samo spoznajnim urušavanjem nego i promjenama ponašanja i osobina ličnosti.¹ Demencija je prvenstveno klinička dijagnoza, a laboratorijski testovi i slikovni prikaz strukture i aktivnosti mozga doprinose točnijem ustanovljavanju uzroka sindroma demencije. Kod postavljanja dijagnoze, izuzetno je važna dobro uzeta anamneza i heteroanamneza, zatim detaljan somatski i neurološki status te ispitivanje kognitivnih funkcija bolesnika na temelju poznatih testova, npr. Montrealske ljestvice kognitivnih sposobnosti (*Montreal Cognitive Assessment*, MoCA), male ljestvice kognitivnog stanja (*Mini-Mental State Examination*, MMSE), ili pak skale procjene Alzheimerove bolesti (*Alzheimer's Disease Assessment Scale*, ADAS-Cog)²⁻⁴. Zbog čega danas toliko govorimo o demenciji? Demencije postaju sve veći javnozdravstveni problem, medicinski i socioekonomski, dijelom i radi produženja životnog vijeka čovjeka. Podaci za razvijene zemlje govore da je prevalencija demencija u osoba životne dobi 60-64 godine manja od 1%, no od 65-te godine prevalencija se udvostručuje svakih 5 godina te u dobi od 90-95 godina iznosi oko 40%⁵, odnosno u dobi od 70-75 godina iznosi 2-3%, a u dobi 85 godina ili starijoj povećava se na 20-25%.⁶

Broj oboljelih od demencije u alarmatnom je porastu u svim dijelovima svijeta⁷, a neurološke bolesti koje uzrokuju sindrom demencije, prema „*The Global Burden of Disease 2010*“ studiji su treći vodeći uzrok života sa invaliditetom na globalnoj razini.⁸ Delphi Consensus studija pokazala je da je prevalencija demencija viša u Sjedinjenim Američkim Državama (S.A.D.) i nešto niža u manje razvijenim zemljama svijeta, kao npr. onima u Africi i Srednjem Istoku. U zemljama istočne Europe, prevalencija je relativno uniformna, između vrijednosti prevalencija u S.A.D. i Japanu. Te se razlike djelomično pripisuju metodološkoj nejednakosti u navedenim

istraživanjima, što uključuje i nejednakosti u dijagnostičkim kriterijima. Osim toga, problem predstavlja i neujednačenost u prosječnoj životnoj dobi ispitanika, obzirom da je u razvijenim zemljama očekivano trajanje života dulje nego u slabije razvijenim zemljama, a svakako treba uzeti u obzir i obrazovanje, stil života koji uključuje redovitu tjelesnu aktivnost, kvalitetu prehrane, izloženost čimbenicima okoliša i slično.^{8,9}

Alzheimerova bolest (AB) je najčešći primarni uzrok sindroma demencije, te je glavni uzrok u gotovo 80% svih bolesnika s demencijom. Postavljanje točne dijagnoze mogu otežavati druga dva relativno česta primarna uzroka sindroma demencije čija klinička slika može biti relativno slična AB: vaskularna demencija (VaD) i frontotemporalna demencija (FTD). Poznavanje glavnih simptoma i patologije svakog tipa demencije može nam pomoći u postavljanju dijagnoze, tako da možemo primijeniti odgovarajuće liječenje te osigurati maksimalno moguću kvalitetu života.¹⁰

Uz već spomenute VaD i FTD, kao primarni uzrok demencije uz AB postoji još nekoliko manje učestalih uzroka: demencija zbog nakupljanja Lewyjevih tjelešaca (DLB, *dementia with Lewy bodies*) i Creutzfeldt-Jacobovu bolest (CJB, *Creutzfeldt-Jacob disease*). Osim toga, sindrom demencije može biti sekundarna posljedica nekih drugih bolesti, od kojih možemo izdvojiti demencijski kompleks kod AIDS-a, demenciju uzrokovanu Parkinsonovom bolesti, demenciju uzrokovanu metaboličkim disbalansom (hipotireozom, hipertireozom, nedostatkom vitamina B12 i folne kiseline), demenciju povezanu s neurosifilisom. Također postoje i drugi, manje učestali primarni i sekundarni uzroci sindroma demencije.¹¹

1.2. Vaskularna demencija (VaD)

VaD je drugi najčešći primarni uzrok sindroma demencije, odmah nakon AB. To stanje nije samo jedna bolest, već predstavlja veliku skupinu kliničkih entiteta povezanih s vaskularnim promjenama. Najvažnije obilježje većine tih bolesti jest da se mogu prevenirati djelovanjem na rizične čimbenike, zbog čega je važno što ranije postavljanje dijagnoze.¹² Koncept VaD prepoznat je prije više od stoljeća, no definicija, razumijevanje patofizioloških mehanizama i dijagnostički kriteriji značajno su se mijenjali s vremenom. Danas se pojam VaD prvenstveno odnosi na „stanje s kognitivnim oštećenjem koje nastaje kao rezultat cerebrovaskularne bolesti te ishemijskih ili hemoragičkih oštećenja mozga“. Obzirom da svi bolesnici koji imaju

moždani udar ne ispunjavaju u potpunosti kriterije za demenciju, ali mogu imati poteškoće koje značajno utječu na njihovo svakodnevno funkcioniranje i kvalitetu života, pojam VaD danas se često zamjenjuje sa širim pojmom vaskularnog kognitivnog urušavanja (*vascular cognitive impairment, VCI*).¹³

1.1.1. Povijest VaD

Povijesno gledajući, koncept demencije potječe iz 16. stoljeća kad je Pratensis u svom radu „*De cerebri morbis*“ spomenuo „demenciju koja korelira s moždanim udarom“. Willis ubrzo nakon toga opisuje najvažnije uzroke demencije vezane uz starenje i vaskularne bolesti te opisuje prvog bolesnika s VaD. Početkom 19. stoljeća Cook opisuje intelektualni deficit kao posljedicu moždanog udara.¹⁴

Početkom 20. stoljeća Binswanger i Alzheimer su objavili niz kliničko-patoloških studija kojima su pokušavali opisati kliničko-patološke korelate različitih oblika demencije, te opisali četiri oblika VaD: aterosklerotsku moždanu degeneraciju, perivaskularnu gliozu moždane kore, demenciju nakon moždanog udara i Binswangerov kronični progresivni subkortikalni encefalitis.^{15,16} Prvi i Drugi svjetski rat značajno su usporili napredak u većini znanstvenih područja, pa tako i u ovome. Stoga nije bilo značajnih otkrića sve do 1946. godine, kad je opisana multiinfarktna demencija. Tada je prepoznata i uloga „tihog infarkta mozga“ u razvoju sindroma demencije.¹⁷ Danas se isto tako zna da je moguće naći vaskularna oštećenja i u bolesnika s AB. Preciznije, smatra se kako više od 30% bolesnika s AB zadovoljava kriterije za neki oblik patologije.¹⁸

1.1.2. Kriteriji za dijagnozu VaD

Kako bismo mogli postaviti dijagnozu VaD, moramo imati objektivno dokumentirane vaskularne lezije koje su etiološki povezane sa sindromom demencije. Današnji klinički kriteriji sastavljeni su na temelju mišljenja stručnjaka, a temelje se na dosadašnjem znanju i patogenetskoj hipotezi uzroka demencije. Pored toga, svakako se mora istaknuti i značaj Hatchinskijevog ishemijskog skora (HIS, *Hatchinski ishaemic score*), odnosno ljestvice, koja se primijenjuje od ranih 70-tih godina prošlog stoljeća, pa i danas na većini klinika, posebno u našoj zemlji.^{19,20} HIS ljestvica detaljno je objašnjena kasnije u tekstu.

U postavljanju dijagnoze VaD odnosno AB koristimo sljedeće kriterije: Dijagostički i statistički priručnik mentalnih bolesti i poremećaja – IV izdanje (*Diagnostic and statistic manual for mental disorders, DSM-IV*)²¹, kriterije Nacionalnog instituta za neurološke i komunikacijske poremećaje i moždani udar – Asocijacije za Alzheimerovu bolest i srodne poremećaje (*National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke – the Alzheimer's disease and Related Disorders Association, NINCDS ADRDA*)²², kriterije Nacionalnog instituta za neurološke poremećaje i moždani udar – Međunarodne udruge za istraživanja i obrazovanje u neuroznanosti (*National Institute for Neurological Disorders and Stroke - Association Internationale pour la Recherche et l'Enseignement en Neurosciences, NINCDS AIREN*)²³, te smjernice Europske Federacije Neuroloških Društava – Europskog Neurološkog Društva (*European Federation of Neurological Societies-European Neurological Society, EFNS-ENS*) smjernice za dijagnostiku i liječenje bolesti povezanih sa sindromom demencije²⁴, kao i Međunarodnu klasifikaciju bolesti, 10. izdanje, MKB-10 (International Classification of Disease - 10th edition, ICD-10)²⁵. Unatoč brojnim pokušajima, još uvijek nema jednoznačno prihvaćenih supstrata koji bi bili uključeni u trenutne kliničke kriterije.²⁶⁻²⁹ Ta je činjenica direktna posljedica nedovoljnog poznavanja uzroka i patofizioloških mehanizama nastanka navedenih bolesti.

1.1.3. Epidemiologija VaD

Obzirom na spomenute teškoće u dijagnosticiranju VaD, te metodološke i druge razlike, vrlo je teško procijeniti epidemiološke podatke o učestalosti demencija. U kliničkim studijama, prevalencija VaD varira od 4.5 do 39%, dok prema *Western memory clinic* varira od 8-15.8%, sa standardiziranom stopom incidencije između 0.42 i 2.68 na 100 tisuća stanovnika. Incidencija VaD je oko 3.8%, odnosno u životnoj dobi ispod 70 godina iznosi 0.7 do 3.9, dok u dobi iznad 80 godina iznosi 6-8 do 50 oboljelih na tisuću stanovnika godišnje.^{30,31}

1.1.4. Patološke promjene kod VaD

Patološke promjene u bolesnika s kognitivnim promjenama zbog vaskularnih oštećenja zahvaćaju različita područja mozga i variraju u brojnosti i veličini, tako da možemo govoriti o žarišnim, višezarišnim (multifokalnim) i difuznim oštećenjima

mozga. Lezije mogu uključiti teritorijalne infarkte opskrbnih područja velikih arterija, distalna polja terminalnih ogranaka moždanih arterija (*watershed/borderzone*), male lezije ili lezije srednje veličine u funkcionalno važnim dijelovima mozga, lakunarne infarkte i ožiljke, lezije bijele tvari mozga, nepotpuna ishemijska oštećenja, hipokampalne lezije i skleroze. Sva ta oštećenja nastaju različitim vaskularnim mehanizmima, koji uključuju bolesti velikih i malih krvnih žila, kardijalne i emboličke događaje, hemodinamske mehanizme i različite druge etiologije.^{32,33} Prema jednoj od mnogobrojnih podjela, višežarišna/difuzna bolest može uključivati: 1. multiple aterosklerotske (*watershed*) infarkte (velike arterije/*borderzone* teritoriji), 2. ishemiju ovisnu o antifosfolipidnim protutijelima, 3. granularnu atrofiju moždane kore (višežarišni kortikalni infarkti), 4. višestruke lakunarne infarkte (zbog mikrovaskularne bolesti ili mikroateroma), 5. Binswangerovu subkortikalnu leukoencefalopatiju (BSLE), 6. cerebralnu autosomno dominantnu arteriopatiju sa subkortikalnim infarktima i leukoencefalopatijom (CADASIL), 7. angiitis (primarni angiitis središnjeg živčanog sustava – PCNSA, granulomatozni angiitis), 8. cerebralnu amiloidnu angiopatiju (CAA), 9. miješane angiopatije (npr. fibromuskularna displazija, Moyamoya bolest), 10. kortikalnu laminarnu nekrozu (stanje nakon kardijalnog aresta, hipotenzije), 11. ekstremnu dilataciju / povećanje moždanih parenhimalnih perivaskularnih prostora. Žarišna bolest odnosno strateški raspoređeni infarkti uključuju: 1. mezijalne temporalne (uključujući hipokampalne) infarkte, ishemije ili skleroze, 2. infarkte u području nukleusa kaudatusa ili talamusa (posebno dorzomedijalnog talamusa), 3. frontocingularne infarkte (opskrbno područje prednje moždane arterije), 4. infarkte u području angularne vijuge dominantne hemisfere.³⁴

Za prognozu VaD od važnosti su brojni čimbenici koji uključuju volumen destruiranog moždanog tkiva, lokalizaciju destrukcije, te broj cerebrovaskularnih lezija. Tomlinson i suradnici smatraju da gubitak moždanog tkiva veći od 100 ml svakako dovodi do demencije, dok gubitak mozgovine između 50 i 100 ml ne mora nužno biti povezan s demencijom³⁵. No, već i gubitak od 20 ml, ako je lociran na "strateški" važnim područjima, može dovesti do sindroma demencije. Zbog toga se smatra da je gubitak mozgovine od 40 do 50 ml važan za razvoj VaD, dok se u bolesnika s AB u kojih se nađu i vaskularne lezije ili kod komorbiditea AB i VaD (miješana demencija, *mixed dementia*) značajnim smatra već i gubitak od 10 ml moždanog tkiva.³⁶ Pri tome je anatomska lokalizacija cerebrovaskularnih lezija često

važniji čimbenik za prognozu VaD nego sam volumen tkivne destrukcije.³⁷ Naime, infarkti u lijevoj hemisferi i bilateralne nekroze s jačim oštećenjem dominantne hemisfere povećavaju rizik od demencije nakon moždanog udara.^{38,39,40} Tako, na primjer, vaskularne lezije u angularnoj vijuzi dominantne hemisfere pokazuju više sličnosti u kliničkoj slici sa sindromom demencije uzrokovanim AB, nego ista takva oštećenja u nedominantnoj hemisferi.^{41,42} Kognitivno oštećenje nakon moždanog udara je također češće povezano s lezijama u opskrbnom području prednje lijeve (*arteria cerebri anterior*, ACA) i stražnje lijeve moždane arterije (*arteria cerebri posterior*, ACP)^{40,43} te nakon bilateralne okluzije ACP.⁴² Bilateralni talamički infarkti su povezani s deficitom dugoročnog pamćenja i subkortikalnom demencijom⁴⁴⁻⁴⁶, kao i lakunarni infarkti bazalnih ganglija, posebno glave nukleusa kaudatusa^{47,48} i tzv. "donjeg" koljena prednjeg dijela kapsule interne, jer prekidaju kortikotalamičke i talamokortikalne puteve.^{49,50} U bolesnika s VaD, infarkti hipokampusu zapaženi su u 48%, u sljepoočnom režnju u 91%, te u bazalnim ganglijima u 83% slučajeva.⁵¹ Ipak, entorinalna moždana kora i hipokampus su u VaD manje zahvaćeni subkortikalnim cerebrovaskularnim lezijama nego kod AB.⁵²

Iako koncept VaD ukazuje da multipli mali infarkti mozga, bez obzira na njihov volumen, mogu dovesti do spoznajnog urušavanja, tek se u manjem broju studija proučavao navedeni koncept. Većina autora smatra kako nalaz prosječnog broja infarkta od 5.8 do 6.7 u dementnih u usporedbi s 3.2 infarkta u nedementnih bolesnika ukazuje na ključnu važnost stanja krvnih žila na stupanj očuvanosti kognicije³⁸. Na istu činjenicu ukazali su i Erkinjuntti i suradnici³⁹, nakon ustanovljavanja prosječnog broj vaskularnih lezija od 5.8 u bolesnika s VaD u usporedbi sa samo 0.2 lezija u bolesnika s miješanom demencijom. To se posebno odnosi na infarkte u opskrbnom području ACA i srednje moždane arterije (*arteria cerebri media*, ACM). No, iako su važni lokacija infarkta te broj lezija, na spoznajno urušavanje utječu i brojni drugi čimbenici kao što su životna dob, sistemske bolesti, druge lezije mozga, promjene bijele tvari, atrofija mozga i stupanj obrazovanja.⁵³

Uspoređujući neuropatološke nalaze u starijih dementnih bolesnika koji nisu imali patološke promjene tipične za AB s nedementnim zdravim ispitanicima, Esiri i suradnici uočili su pozitivnu korelaciju između mikrovaskularnih moždanih oštećenja i stupnja demencije. Izraženiji lakunarni status, mikroinfarkti mozga i kortikalna amiloidna angiopatija su bili najviše zastupljeni među dokumentiranim

neuropatološkim promjenama u obduciranih dementnih bolesnika.⁵⁴ Jellinger je obducirajući 130 starijih bolesnika, starosti između 80 i 92 godine, u 91 dementnog bolesnika (MMSE: 10 ± 4) evidentirao 27% bolesnika sa starim infarktom mozga, dok je 52% obduciranih imalo višestruke subkortikalne lakune, 9% kortikalne i subkortikalne mikroinfarkte te 4.5% hipokampalnu sklerozu. U bolesnika s MMSE 20, 31% ih je imalo velike cistične infarkte, 52% multiple subkortikalne lakune, a preostali multiple infarkte. U 20 kognitivno zdravih kontrolnih bolesnika, 2/3 imalo je cistične infarkte, 30% multiple subkortikalne lakune bez lezija talamusa, a jedan bolesnik je imao multiple stare infarkte. Ti podaci ukazuju da su subkortikalne lakune i multipli diseminirani infarkti najčešći morfološki nalaz u bolesnika s VaD, dok su veliki cistični infarkti puno rjeđi nalaz.⁵⁵

VaD može biti uzrokovana žarišnim, višezarišnim ili difuznim vaskularnim/ishemičnim lezijama različitih, ali često funkcionalno važnih dijelova mozga i neuralnih veza, što dovode do deaferentacije čeonih i limbičkih te prekida veza između bazalnih ganglija i moždane kore velikog mozga, te kortikokortikalnih i ascedentnih puteva putem lezija u bazalnim ganglijima, talamusu, bijeloj tvari mozga i subfrontalnim područjima. Strateški smještene male lezije mogu dovesti do destrukcije talamokortikalnih, strijatokortikalnih i puteva između prefrontalnog korteksa i bazalnih ganglija, zahvaćajući kogniciju, pretvorbu kratkoročnog u dugoročno pamćenje i ponašanje.⁵⁶⁻⁶⁴

1.1.5. Neurokemijske promjene kod VaD

Neurokemijske studije VaD pokazale su brojne abnormalnosti u ključnim neurotransmiterskim sustavima, posebno u bazalnom kolinergičnom sustavu, uzrokujući diskonekciju u kolinergičnim projekcijama prema moždanoj kori velikog mozga.⁶⁵⁻⁶⁷ Obzirom da kolinergička transmisija ima važnu ulogu u regulaciji cerebralnog protoka,⁶⁸⁻⁷⁰ njegova disfunkcija može uzrokovati smanjenje cerebrovaskularnog protoka i hipoperfuziju kao ključne čimbenike u patogenezi VaD.^{63,64,65,65,67} Neke studije pokazale su značajnu redukciju aktivnosti kolin-acetiltransferaze i izraženosti muskarinskih receptora na piramidnim neuronima hipokampusa⁷¹, uz očuvanje nikotinskih receptora.⁷² Broj neurona u Meynertovoj bazalnoj jezgri smanjen je i u AB i u VaD.⁷³ Kolinergički deficit u VaD dokumentiran je i u eksperimentalnim i u kliničkim studijama, kao i na životinjskim modelima

bolesti.^{72,74,75} AB i miješana demencija obično imaju veći deficit u aktivnosti kolin-
acetiltransferaze u sljepoočnim dijelovima moždane kore nego skupine bolesnika s
VaD.⁷⁶ Značajan kolinergički deficit u čeonim i sljepoočnim dijelovima mozga nađen
je i u bolesnika sa CADASIL-om.⁷⁷ U bolesnika sa Binswangerovom bolesti je
utvrđena redukcija sinaptofizina kao mjere gustoće sinaptičkih proteina.⁷⁸ Osim toga,
kod VaD je nađena i redukcija izraženosti vazopresina i histamina zbog lezija u
supraoptičkim i tuberomamilarnim jezgrama.⁷⁹ Lezije u strijatonigralnom
dopaminergičkom sustavu zbog lakunarnih infarkta u bazalnim ganglijima i/ili sivoj
tvari mozga mogu dovesti do vaskularnog parkinsonizma.⁸⁰⁻⁸⁴

1.1.6. Podjela VaD na temelju patoloških promjena

VaD predstavlja heterogenu grupu bolesti i velik su izazov za kliničare,
neuroradiologe i neuropatologe, posebno zato jer nema dovoljno studija koje bi dale
točne definicije i pravovaljane zajedničke kriterije bolesti.⁸⁵ U tom su smislu vrlo
važne patološke studije, budući da mogu potvrditi odnosno otkriti vaskularna
moždana oštećenja i onda kada se ta oštećenja ne mogu adekvatno prikazati
neuroradiološkim metodama. Osim toga, patološkim studijama može se odrediti tip
eventualne cerebrovaskularne bolesti koja stoji u podlozi oštećenja (arterioskleroza,
fibrohijalinoza, amiloidna angiopatija), a uz to mogu verificirati proširenost patološkog
procesa.⁸⁶ S druge strane, mnogi stariji pacijenti imaju pojedine morfološke promjene
koje se mogu vidjeti i u AB i u VaD, a da ipak ne ispunjavaju kriterije za navedene
bolesti.^{87,88} Newcastle grupa⁸⁹ predložila je podjelu VaD na temelju ključnih varijabli
koje definiraju patologiju vaskularnih promjena u 6 podtipova:

I. veliki infarkt ili nekoliko infarkta koji dovode do gubitka više od 50 ml moždanog
tikva – multiinfarktna demencija;

II. multipli mali infarkti ili mikroinfarkti (više od 3 s minimalnim promjerom od 5 mm),
bolest malih krvnih žila (*small vessels disease*), CAA, lakunarni infarkti,
perivaskularne promjene, mikrohemoragije, te lezije bijele tvari, leukoaraijoza i
Binswangerova bolest;

III. strateški infarkti (talamus, hipokampus, bazalna područja prednjeg mozga);

IV. cerebralna hipoperfuzija (hipokampalna skleroza, ishemično-anoksična oštećenja, kortikalna laminarna nekroza, infarkti graničnih opskrbnih područja koji uključuju tri različite koronalne razine);

V. cerebralna hemoragija (lobarna, intracerebralna, subarahnoidalna);

VI. cerebrovaskularne promjene s patologijom karakterističnom za Alzheimerovu bolest (iznad Braakovog stadija III za neurofibrilarne promjene), miješana demencija, kombinirane cerebrovaskularne lezije.

Podtipovi I-III najčešće su povezani sa jasnom kliničkom slikom moždanog udara. Podtip I obično je posljedica okluzije velike krvne žile aterotromboembolizmom, arterijsko-arterijskom embolizacijom ili kardioembolizmom. Podtip II obično uključuje definiran proces arterioskleroze, lipohijalinoze, amiloidne ili kolagene angiopatije. Podtipovi I, II i V mogu biti rezultat aneurizme, arterijske disekcije, arteriovenske malformacije te različitih oblika vaskulitisa.⁸⁹ Novijeg je datuma i istraživanje povezanosti patoloških vaskularnih promjena i kognicije koji su proveli Deramecourt i suradnici⁹⁰. Na temelju vlastitih rezultata, navedeni su autori napravili semikvantitativnu podjelu cerebrovaskularnih lezija u četiri moždane regije (sa skorom od I do IV/VI). Prema tim autorima, najbolje je pratiti sljedeća područja mozga: čeon i sljepoočni režanj, hipokampus te bazalne ganglije. U području čeonog i sljepoočnog režnja skor nula (0) označava normalan izgled mozga, krvnih žila, bijele tvari i moždane kore, skor I označava blaže promjene stijenki krvnih žila, perivaskularnih prostora i bijele tvari; skor II odnosi se na umjerene do izražene, ali izolirane promjene stijenki krvnih žila, često s depozitima hemosiderina u perivaskularnim prostorima; skor III govori za umjerene do izražene dilatacije perivaskularnih prostora ili za promjene u dubokoj bijeloj tvari mozga kao i u jukstakortikalnoj bijeloj tvari; u skoru IV vidljiv je i umjeren do teži gubitak mijelina; u skoru V vidljiva je prisutnost kortikalnih mikroinfarkta, dok je kod skora VI vidljiv veliki moždani infarkt. U području hipokampusa i bazalnih ganglija, skor 0 označava normalan izgled, kod skora I prisutne su blage promjene na stijenkama krvnih žila i perivaskularne promjene, kod skora II te su promjene izraženije, kod skora III prisutni su mikroinfarkti te kod skora IV veliki infarkti.⁹⁰

U starije populacije se sa sve većom učestalošću može dijagnosticirati i tzv. miješana demencija. Naime, s vremenom se povećava vjerojatnost za komorbiditet,

pa u starijih ljudi često nalazimo na kombinaciju različitih patoloških nalaza, npr. AB s cerebrovaskularnom i/ili Lewy body patologijom.^{91,92}

1.1.7. Podtipovi VaD ovisno o uzroku nastanka vaskularne lezije

1.1.7.1. Primarna intrakranijska krvarenja

Primarna intrakranijska hemoragija je vrlo rijedak uzrok VaD. Većina masivnih krvarenja u području bazalnih ganglija, posebno onih s prodorom krvi u moždane komore i sabijanjem moždanog debla završava smrtno. Do poremećaja kognicije češće dovode multiple sitne hemoragične zone u moždanoj kori i bijeloj tvari mozga.^{93,94} Sindrom demencije povezan s cerebralnom hemoragijom i/ili hemoragičnim infarktima obično se javlja s pridruženim sporadičnim ili obiteljskim oblikom CAA⁹⁵⁻⁹⁷ i drugim nasljednim oblicima VaD.⁹⁸

1.1.7.2. CAA

Sporadična CAA definirana je kao nakupljanje amiloid- β peptida ($A\beta$) u zidovima meningealnih i intrakortikalnih arterija, arteriola, kapilara te rijetko vena, sa zadebljanjem njihovog zida i degeneracijom glatkih mišićnih stanica, katkad i s dodatnim širenjem u okolni neuropil ili depozicijom u gliju i kapilarni zid (capCAA).⁹⁹ U uznapredovalim slučajevima CAA dolazi i do značajnih strukturalnih promjena, od kojih je najteža fenomen „dvostruke cijevi“ (*double barrelling*) pri čemu dolazi do odvajanja i delaminacije vanjskog dijela tunike medije. Porijeklo $A\beta$ u stijenkama krvnih žila slabo je razumljivo, te se razmatra nekoliko mehanizama: 1) sistemska hipoteza sugerira da $A\beta$, barem djelomično, potječe iz cirkulacije^{100,95,96}, 2) prema vaskularnoj hipotezi glatke mišićne stanice unutar zida krvne žile i/ili pericita stvaraju $A\beta$ ^{100,101}, 3) drenažna hipoteza sugerira da $A\beta$ proizvode neuroni prilikom perivaskularnog oštećenja tj. pri prijetećem moždanom udaru^{99,102-104}, 4) drugi patogenetski mehanizmi⁹⁷.

Iako je poznat i nasljedni oblik CAA, češći je sporadični oblik bolesti. Infiltracija žilnog zida s $A\beta$, gubitak glatkih mišićnih stanica, fibrinoidna nekroza i nastanak mikroaneurizmi su mehanizmi kojima CAA napreduje i postaje simptomatska.^{95-97,105}

CAA se danas smatra jednim od glavnih uzroka nehipertenzivnih i neaterosklerotskih cerebrovaskularnih lezija, uključujući višestruke kortikalne hematome i višestruke infarkte u starijih osoba,^{99,106-108} koji imaju važnu ulogu u patogenezi demencija. Isto tako, ti procesi mogu biti povezani s vaskulitisom, kao što je granulomatozni arteritis gigantskih stanica.^{95-97,105} Intracerebralne hemoragije povezane s CAA vide se u 5-20% spontanih netraumatskih krvarenja u starijih osoba.^{109,110} Ta krvarenja uglavnom su locirana u čeonotjemenom (35%), tjemenom (11-26%), sljepoočnom i zatiljnom režnju (5-18%), te u bazalnim ganglijima (5-10%), a isto tako se mogu javiti i kao višestruke istovremene hemoragije.^{97,111} Patologija CAA i mikrokrvarenja mogu se naći i u bolesnika s AB, no svakako bi se kod tih bolesnika trebala isključiti hipertenzija ili cerebrovaskularna bolest kako bi se mogla postaviti točna dijagnoza.¹¹² Definitivno, nalaz hema kao markera cerebralnog krvarenja te amiloida kao markera plaka češće se nađe u dementnih nego u nedementnih osoba, što ukazuje da je senilni plak vjerojatno nastao na mjestu mikrohemoragije.¹¹³ CAA je povezana i s nalazom ishemičnih infarkta, a što je izraženija prisutnost promjena do kojih dovodi CAA, veća je i učestalost nalaza ishemičnih infarkta.¹¹⁴⁻¹¹⁶ CAA može dovesti i do lezija u području bijele tvari mozga.¹¹⁷ No, iako je CAA neovisan rizični čimbenik za te lezije, njegova uloga je ipak bitno manja u samom patogenetskom procesu nastanka promjena u bijelog tvari koji uključuje fibrohijalinozu krvnih žila.¹¹⁸ Na komorbiditet ta dva procesa upućuje nalaz oštećenja bijele tvari te pojavnost lobarnih hemoragija.¹¹⁹ Iako je uloga CAA u demenciji neosporna, sam primarni uzrok demencije i dalje nije jasan. Naime, patologija CAA djeluje agravirajuće na druge patološke procese ubrzavaći tako nastanak drugih simptoma sindroma demencije koji zato postaju i ranije klinički uočljivi.^{120,121}

Obiteljski oblik CAA može biti uzrokovan mutacijom različitih gena i uglavnom se manifestira kao demencija udružena s CAA te višestrukim cerebralnim krvarenjima i infarktima. Može biti uzrokovan odlaganjem A β zbog mutacije *APP* (*Amyloid Precursor Protein*) gena na kromosomu 21, ili mutacijama gena za neke druge proteine, npr. transtiretin, cistatin, gelsolin, koji se nalaze na kromosomima 8, 9 i 13, respektivno. Navedene se mutacije obično nasljeđuju autosomno dominantno i relativno su rijetke.¹²²⁻¹³⁰

S nasljednim oblikom VaD povezane su i neke druge bolesti, kao što su nasljedna multiinfarktna demencija, cerebralna autosomalna dominantna arteriopatija sa subkortikalnim infarktima i leukoencefalopatijom (CADASIL), cerebralna autosomna recesivna arteriopatija sa subkortikalnim infarktima i leukoencefalopatijom (CARASIL), cerebroretinalna vaskulopatija, nasljedna endotelopatija s retinopatijom, nefropatijom i moždanim udarom (CRV i HERNs) te MELAS sindrom (mitohondrijalna encefalomiopatija, laktoacidoza i ponavljajuće epizode napadaja koje nalikuju moždanom udaru).⁹¹

1.1.7.3. CADASIL

Od navedenih nasljednih oblika VaD najčešće se javlja CADASIL. Obično počinje u srednjoj životnoj dobi s anamnezom malih lakunarnih moždanih udara, migrenom, progresivnom demencijom i pseudobulbarnom paralizom. Bolest je uzrokovana mutacijom *NOTCH3* gena na dugom kraku kromosoma 19. Neuropatološki, nalazimo višestruke male, duboko locirane infarkte, difuznu leukoencefalopatiju te raširenu vaskulopatiju koja dovodi do fibroznog zadebljanja zida arteriola s ili bez obliteracije malih krvnih žila. Takve se promjene žila ne nalaze samo u mozgu, već i u drugim organima (slezini, bubrezima, mišićima, koži).^{131,132,98,112,113} Kolinergičku denervaciju u CADASIL-u vidimo u tjemenu, čeonom i zatiljnom dijelu mozga, a područja poput entorinalne i sljepoočne moždane kore koja su uobičajeno zahvaćena u Alzheimerovoj bolesti, čine se pošteđenima.¹¹⁴ Novije studije ipak pokazuju određene promjene i u tim dijelovima.^{115,133,134}

1.1.7.4. CARASIL, CRV, HERNs

Druge nehipertenzivne, neamiloidne arteriopatije s lakunarnim infarktima sličnim onima kod CADASIL-a, vidljive su i kod CARASIL-a, no ta se bolest nasljeđuje recesivno. Uz pseudobulbarne se javljaju i simptomi oštećenja lokomotornog sustava, a među patološkim nalazima značajne su i promjene malih penetrantnih arterija bijele tvari mozga i bazalnih ganglija. Točan uzrok za sada nije poznat.⁹¹

CRV i HERNS su druge dvije rijetke nasljedne bolesti malih krvnih žila, koje uključuju progresivno oštećenje vida, glavobolje, moždane udare, te kognitivno urušavanje, a vjerojatni genski uzrok mapiran je na lokus 3p21.¹³⁵

1.1.7.5. MELAS

Po svojoj naravi potpuno različit poremećaj je MELAS sindrom (mitohondrijska encefalomiopatija, laktoacidoza te epizode slične moždanom udaru), a u otprilike 80% bolesnika uzrokovan mutacijama mitohondrijskog gena *TL1*, dok su u preostalih 20% bolesnika mutirani mitohondrijski geni *ND1*, *ND5*, *TH* i *TV*.. Zbog navedenih mutacija oštećena je mitohondrijska funkcija proizvodnje energije iz šećera. Bolest je karakterizirana epizodama sličnim moždanom udaru, epileptičkim napadajima te demencijom koja se razvija prije 40 godine života.^{136,137}

1.1.8. Postavljanje dijagnoze VaD

Kao što je već ranije navedeno, unatoč brojnim predloženim dijagnostičkim kriterijima za VaD te uz bolje znanje o patologiji i patofiziologiji VaD, još uvijek je teško rano postaviti dijagnozu demencije te što je katkad i važnije, razlučiti vaskularnu od drugih vrsta demencije (o čemu ovisi početak liječenja). Pregledom dijagnostičkih kriterija, može se zaključiti da NINDS-AIREN kriteriji²⁴ nude jedan praktičan pristup koji se temelji na tri glavna elementa pomoću kojih se dolazi do dijagnoze VaD. Ta tri elementa su: kognitivno urušavanje, cerebrovaskularne lezije dokazane kompjutoriziranom tomografijom (CT) ili pomoću magnetske rezonancije (MR) mozga te isključivanje drugih uzroka demencije, prvenstveno AB.¹³⁸

NINDS-AIREN kriteriji zahtijevaju objektivan dokaz demencije validiran neuropsihološkim testovima. Obično se kao početnim testom služimo se s MMSE, no taj test pokazao se pogodnijim za primarne (kortikalne) uzroke sindroma demencije, posebice Alzheimerovu bolest. VaD zahtijeva testove kortikalne disfunkcije kao i testove izvršnih sposobnosti.¹³⁹ Jedan od pogodnih testova za to je test crtanja sata (*clock-drawing test*, CDT)¹⁴⁰ ili pak test verbalne fluentnosti (*Trail Making Test*, TMT), u kojemu treba spojiti u pravilnom slijedu 25 kružića na papiru ili monitoru označenih brojevima, A dio testa, ili naizmjenično brojevima i slovima, B dio testa).¹⁴¹

Lezije mozga važno je prikazati slikovnim neuroradiološkim tehnikama, jer kao što je i ranije u neuropatološkim razmatranjima rečeno, važan prediktor VaD je slikovni prikaz strateških smještenih lakunarnih oštećenja, periventrikularne ishemije ili pak nalaz višestrukih kortikosubkortikalnih oštećenja. No, posebice pomoću MR mozga, može se lako odrediti i stupanj hipokampalne atrofije, te volumen kortikalne sive tvari kao i lezije bijele tvari mozga (ali ne lakune) kao znak VaD^{142,143} Prema definiciji, odsutnost vaskularnih lezija na slikovnom prikazu mozga pomoću MR nije spojiva s VaD.¹⁴⁴ Zbog toga postoji praktičan problem kako što ranije razlučiti VaD i AB. Situaciju dodatno otežava ako pacijent uz kognitivne i ponašajne probleme ima i nizak broj bodova na MMSE ljestvici te prisutnost vaskularnih lezija na MR slikovnom prikazu strukture mozga. Stoga se često postavlja pitanje radi li se tu o VaD, komorbiditetu Alzheimerove i cerebrovaskularne bolesti ili samo AB? *Hachinski ischemic score* (HIS)²⁰ nam može nam značajno pomoći u načelnom razlikovanju VaD i AB u svakodnevnom kliničkom radu.

Prema HIS, skor veći ili jednak 7 sukladan je multiinfarktnoj demenciji, skor manji ili jednak 4 govori u prilog AB, dok skor od 5 ili 6 bodova ukazuje na komorbiditet AB i cerebrovaskularne bolesti (miješana demencija, *mixed dementia*). U recentnim meta-analizama, pokazalo se da je u VaD u odnosu na AB, puno češći nalaz postupne, ali diskretne („*stepwise*“) deterioracije (u nizu jasnih koraka, pri čemu svaki korak obično predstavlja jedan vaskularni incident), fluktuirajući tijek, anamneza hipertenzije, anamneza moždanog udara ili prisutnost žarišnog neurološkog ispada.¹⁴⁵

Ipak, sam klinički tijek bolesti, slikovni prikaz strukture mozga pomoću MR, dostupni neuropsihološki testovi i dostupne ljestvice kao što je HIS^{20,145}, ne mogu osigurati točnost u postavljanju dijagnoze. Cerebrovaskularne lezije nađene su kod većine bolesnika s AB kod kojih je bolest nastupila u starijoj životnoj dobi te u polovine oboljelih u mlađoj životnoj dobi.¹⁴⁶ Isto tako, patološke promjene tipa vaskularnih lezija mogu se naći i u osoba koje nisu dementne, dok se kod određenog postotka dementnih osoba nisu našle promjene koje bi mogle biti odgovorne za navedeno stanje, što su u studiji provedenoj u osoba starijih od 90 godina pokazali Corrada i suradnici.¹⁴⁷ Mikrovaskularne promjene uočene u mozgovima starijih osoba kao i u onih s AB, ukazuju na oštećenje cerebralne perfuzije, posebice redukciju regionalog protoka krvi, redukciju transporta i utilizacije glukoze, gubitak vaskularne

inervacije, napose kolinergičke, ali i drugih neurotransmitorskih sustava.¹⁴⁸ Oštećenje neurovaskularne inervacije, ultrastrukturalne promjene u kapilarama i bazalnoj membrani zbog nakupljanja A β uz disfunkciju krvnomoždane barijere dodatno otežavaju odstranjivanje amiloida. Taj začarani krug promjena konačno dovodi do strukturalne cerebralne dezintegracije u vidu lakuna, infarkta, promjena bijele tvari s daljnjim ugrožavanjem metabolizma neurona, uključujući i mitohondrijski metabolizam oksidativne fosforilacije. Uz to, dolazi do oksidativnog stresa, degradacije proteina, stvaranja lezija s depozicijom A β i neurofibrilarnih snopića. Ti čimbenici oštećuju sinapse, te uzrokuju atrofiju mozga, gubitak živčanih stanica, te u konačnici dovode do kognitivnog oštećenja.^{149,150}

1.2. Alzheimerova bolest

1.2.1. Patološke promjene kod AB

Atrofija mozga jedna je od najizraženijih makroskopskih promjena u AB, a uključuje smanjeni volumen i težinu mozga koja je obično ispod 1100 grama. Najviše su zahvaćeni čeon i sljepoočni režnjevi sa simetrično i difuzno atrofičnim vijugama i posljedično proširenim brazdama. Prve se promjene obično javljaju u medijalnom dijelu sljepoočnog režnja, napose u hipokampusu i entorinalnoj moždanoj kori.^{151,152} Te se promjene vrlo jasno mogu uočiti slikovnim pretragama mozga kao što su MR i CT mozga.^{153,154} Jedno je istraživanje pokazalo da se mjerenjem hipokampalne atrofije pomoću MR može razlučiti bolesnike s AB od kognitivno normalnih osoba s vjerojatnošću od 80-90%.¹⁵⁵ No, tek je nekolicina MR studija pokazalo da se tom metodom može donekle razlikovati AB od drugih primarnih uzroka sindroma demencije, s obzirom na to da hipokampalna atrofija i atrofija entorinalne moždane kore mogu biti prisutne i kod drugih demencija, kao što su FTD i VaD.^{156,157} Ipak, upotrebom dodatnih parametara u očitavanju MR nalaza, kao što je Scheltensov skor^{158,159} i indeks atrofije i oštećenja mozga (*Brain Atrophy and Lesion Index, BALI*)^{160,161} može se poboljšati ranije razlikovanje različitih primarnih uzroka sindroma demencije. Za sada se to još uvijek ne preporučuje za rutinsku analizu, sukladno preporukama Američke neurološke akademije.¹⁶²

Danas znamo da za AB vjerojatno nisu ključne atrofične promjene kakve se viđaju i pri uobičajenom starenju mozga, već specifične neuropatološke promjene koje se mogu vizualizirati histološkom analizom moždanog tkiva oboljelih. Dva glavna neuropatološka obilježja AB su progresivno nakupljanje netopljivog fibrilarnog materijala koji se sastoji od izvanstaničnog A β ¹⁶³⁻¹⁶⁸ i unutarstaničnih neurofibrilarnih promjena.¹⁶⁹⁻¹⁷⁵ Neurofibrilarne promjene pojavljuju se u obliku neurofibrilarnih snopića (*neurofibrillary tangles*, NFT), vlaknaca u neuropilu (*neuropil threads*, NT) te kao neuritički plakovi (NP). NP razlikuju se od senilnih po tome što se u njima pored nakupljenih fibrila od A β nalaze i isprepleteni nastavci neurona u kojima se nalaze lokalno hiperfosforilirani tau proteini. Ukupni broj NP vjerojatno je najkarakterističnije obilježje po kojemu se bolesnici s AB razlikuju od kognitivno normalnih osoba. U početku se javljaju kao difuzni odnosno preamiloidni senilni plakovi (*diffuse plaques*, DP) u kojima A β ima konformaciju α uzvojnice. Kasnije ti DP prelaze u tzv. "primitivne" senilne plakove koji sadrže guste snopiće A β s konformacijom β ploče. Pojavom distrofičkih neurita unutar plaka (*dystrophic neurites*, DN) nastaju neuritički plakovi (NP). NP se obično uobičajeno dijele na distrofične NP s fuziformnim distrofičnim neuritima koji ne koreliraju sa kognitivnim urušavanjem, a mogu se naći i u kognitivno normalnih, zdravih ljudi i drugih sisavaca, te na NP koji sadrže sparane uzvojite filamente (*paired helical filaments*, PHF) i mogu se naći isključivo kod ljudi, naročito kod oboljelih od AB.¹⁷⁶

Raspodjela NP varira ne samo između pojedinih područja mozga u istog ispitanika, već može biti jako varijabilna i između pojedinih bolesnika. Nasuprot tome, NFT i NT pokazuju jednoličniju i više karakterističnu raspodjelu. Heiko i Eva Braak još su 1991. godine obdukcijom 83-ju mozgova dementnih i nedementnih osoba opisali tipične neuropatološke promjene vezane uz AB u odnosu na amiloidne depozite i neurofibrilarne promjene. Difuzni depoziti amiloida su prema tom istraživanju prve promjene koje se mogu dokumentirati u mozgu osobe oboljele od AB, no mogu se naći također i u nedementnih osoba. Veličina i raspodjela tih depozita varira, tako da oni imaju ograničen značaj u procjeni neuropatoloških promjena odnosno stupnjeva zahvaćenosti mozga. Unutarstanične neurofibrilne promjene, posebice NFT i NT, omogućuju bolju procjenu opsega neuropatoloških promjena u AB, a prema Braaku razlikujemo 6 stadija. Prvi i 2. stadij se zbog lokalizacije zajednički još nazivaju i transentorinalni stadij, a uobičajeno

predstavljajući klinički tiho razdoblje bolesti ili predklinički (prodromalni) stadij. Kao što mu ime i govori, neurofibrilarne promjene unutar stanica uočljive su u transentorinalnom području s vrlo blagim zahvaćenjem hipokampusa te odsutnošću promjena u izokorteksu sljepoočne moždane kore. Stadij 3. i 4. nazivaju se još i limbički stadij; on klinički odgovara početnom stadiju AB. Tu su neurofibrilarne promjene uočljive u transentorinalnom i entorinalnom području, u hipokampusu, posebno u CA1 području, u piramidnim stanicama subikuluma, dok je izokorteks sljepoočne moždane kore samo blago zahvaćen, a primarna osjetna i motorička (idiotipska) područja nisu zahvaćena. Stadiji 5 i 6 nazivaju se još i izokortikalnim stadijem bolesti koji odgovara potpuno razvijenoj kliničkoj slici AB. Neurofibrilarne promjene u 5. stadiju zahvaćaju čitav hipokampus, bazalne dijelove medijalnog dijela sljepoočnog režnja, gotovo cijele donje dijelove sljepoočnih i zatiljnih režnjeva, sa širenjem promjena prema anterobazalnim dijelovima inzule i orbitofrontalnoj moždanoj kori, a u 6. stadiju zahvaćen je cijela moždana kora, kao i ekstrapiramidni sustav.^{177,178}

1.2.2. A β u AB

U početku se smatralo da je A β nađen u senilnim odnosno NP abnormalan peptid, no kasnije je otkriveno da nastaje za vrijeme normalnog staničnog metabolizma.¹⁷⁹ A β se sastoji od 39-43 aminokiseline, a nastaje iz veće prekursorne molekule (*amyloid precursor protein*, APP). Normalno sintetizirani APP je transmembranska molekula glikoproteinske strukture, s velikim izvanstaničnim dijelom te malim citoplazmatskim repom. Ima kratko vrijeme poluživota jer se brzo katabolizira djelovanjem triju enzima: α , β i γ sekretaze. α -sekretaza cijepa APP oko sredine A β domene te tako ne nastaje A β već topivi APP α koji je normalan sastojak svih tjelesnih tekućina s dokazanim zaštitnim djelovanjem. β i γ sekretaza sudjeluju u endosomalno-lizosomalnom putu cijepanja APP, pri čemu nastaje A β čija dužina (kraćeg oblika A β_{1-40} ili duljeg oblika A $\beta_{1-42(43)}$) ovisi o poziciji cijepanja γ sekretazom. Dulji oblik je naročito važan jer čini najveći dio NP i skloniji je stvaranju fibrila.¹⁸⁰⁻¹⁸⁸

1.2.3. Hipoteza nastanka AB

Središnja hipoteza kojom se pokušava objasniti nastanak AB nazvana je amiloidna kaskadna hipoteza. Naziv je dobila jer se temelji na neravnoteži u

stvaranju i odstranjivanju A β u mozgu, te činjenice da se smatra inicijalnim događajem koji s vremenom dovodi do svih drugih patoloških promjena, uključujući i odumiranje neurona.¹⁸⁹ Tu hipotezu snažno podupire nalaz određenih mutacija koje vidimo u obiteljskom obliku Alzheimerove bolesti, a koje se odnose na sam *APP* gen, a još više na gene *PSEN1* i *PSEN2*, budući da je presenilin ključni dio multiproteinskog kompleksa γ -sekretaze, čijim djelovanjem prilikom razgradnje APP nastaje A β .¹⁹⁰ Dugotrajno povećanje proizvodnje A β u obiteljskom obliku bolesti dovodi do akumulacije i oligomerizacije A β .¹⁸⁹

Kod sporadičnog oblika AB su također poznati dodatni rizični genetski čimbenici, od kojih je najvažniji genotip *APOE* ϵ 4.¹⁹¹ I druge, za sada manje poznate varijante gena, kao i okolišni čimbenici dovode do nedostatnog odstranjivanja A β s posljedičnim povećanjem razine A β u mozgu. U konačnici, to kao i kod obiteljskog oblika bolesti dovodi do nakupljanja A β najprije u topljive oligomere, a zatim i velike netopljive fibrile u amiloidnim plakovima. Prvotno se smatralo da su toksični samo depoziti A β u plakovima, no kasnija istraživanja pokazala su da i topljivi oligomeri negativno utječu na sinaptičku plastičnost i dugotrajnu potencijaciju sinapsi hipokampusa.^{192,193} Uslijed nakupljanja oligomera A β 42 dolazi do aktivacije mikroglija stanica i astrocita, nakon čega se javlja upalni odgovor te u neuronima dolazi do poremećaja homeostaze iona uz razvitak oksidativnog stresa.¹⁹⁴ Sve to dovodi do disfunkcije neurona i njihovih neurita s pogoršavanjem deficita neurotransmisije, što samo po sebi dovodi do sindroma demencije, no isto tako i utječe na aktivnost kinaza/fosfataza i daljnjeg stvaranja NFT.¹⁸⁹ Važnost NFT u patofiziologiji Alzheimerove bolesti uočena je paralelno s otkrićem A β u NP, kao i nalazom da su snopići sastavljeni od hiperfosforiliranog tau proteina.^{195,196}

1.2.4. Tau protein u AB

Tau protein je prvenstveno aksonalni protein vezan za mikrotubule preko svojih triju (3R) ili četiriju (4R) veznih domena, čime osigurava povezanost i stabilnost mikrotubula. Fosforilacija tau proteina regulirana je ravnotežom kinaza i fosfataza (neke od najvažnijih kinaza su GSK-3 β i CDK5, a najvažnije fosfataze su PP-1 i PP-2A).¹⁹⁷ U AB fosforilacija tau proteina počinje intracelularno i dovodi do odvajanja normalnog tau proteina i drugih s mikrotubulima povezanih proteina, što uzrokuje

razdvajanje mikrotubula te poremećaj aksonalnog transporta i sinaptičku disfunkciju.¹⁹⁷ Tau protein osim toga postaje sklon agregaciji u netopljive fibrile u snopićima, čime se dodatno remeti normalan rad neurona. Kao što je već i ranije navedeno, tau patologija počinje rano, prvo u transentorinalnom području, a zatim se, vjerojatno transneuronalno, širi dalje prema hipokampusu, amigdaloidnim jezgrama, pa sve do asocijativnih dijelova moždane kore.¹⁹⁸

Tau protein čovjeka izražava se u 6 izooblika koje nastaju naizmjeničnim sparivanjem eksona *MAPT* (microtubule-associated protein tau) gena smještenog na dugom kraku kromosoma 17 (17q21).^{199,200} Uobičajeno tau sadrži 2-3 mola fosfata po molu proteina, što je razina fosforilacije potrebna za optimalnu aktivnost tau proteina.²⁰¹ Tau izooblici imaju raspon duljine od 352 do 441 aminokiseline molekulske mase 45 do 65 kDa, s temeljnim eksonima 1, 4, 5, 7, 9, 11, 12 i 13, dok dodatnim uključivanjem ili neuključivanjem eksona 2, 3 i 10 nastaje 6 različitih izooblika. Izooblici se razlikuju po prisutnosti triju (3R) ili četiriju (4R) ponavljajućih slijedova od 31 aminokiseline kojima se tau protein veže za mikrotubule (tau izooblici s uključenim eksonom 10 imaju 4R domene). Naime, tau protein sastavljen je od dvije domene: projekcijske i domene koja služi povezivanju s mikrotubulima. Projekcijska domena tau proteina veže se za neurofilamente ili staničnu membranu što ukazuje na važnu ulogu tau proteina u integraciji mikrotubula s ostalim elementima citoskeleta neurona.^{176, 202-205}

Biolška aktivnost tau proteina tijekom razvoja kontrolirana je fosforilacijom. U fetalno doba je stupanj fosforilacije visok, a zatim slabi aktivacijom fosfataza u postnatalnom razdoblju. Poremećena fosforilacija tau proteina u odraslom mozgu mijenja njegovu konformaciju i dovodi do razdvajanja tau proteina od mikrotubula. Hiperfosforilirani tau sadrži i do 4 puta više fosfata po molu proteina (10-12 mola fosfata po molu proteina) u odnosu na normalni koji ima 2.5-3.5 fosfata po molu proteina.¹⁹⁷ Na najduljem tau izoobliku sastavljenom od 441 aminokiseline izdvojeno je 79 mjesta moguće (hiper)fosforilacije, a većina ih se nalazi na Thr i Ser ostatcima, kojima obično prethodi Pro. Koristeći monoklonska antitijela na tau protein, masenu spektroskopiju i sekvenciranje, izdvojeno je 30-tak najčešćih mjesta na kojima se događa fosforilacija tau proteina.²⁰⁶⁻²¹⁰ U Alzheimerovoj bolesti tau protein najčešće je fosforiliran na sljedećih devet mjesta: Ser-46, Thr-123, Ser-199, Ser-202, Thr-231, Ser-235, Ser-262, Ser-396, te Ser-404.¹⁷⁶

Za hiperfosforilaciju tau proteina može biti odgovorna aktivnost najmanje 15 različitih kinaza (glikogen sintaza kinaza-3 β , kalcij/kalmodulin ovisne protein kinaze, stresom i mitogenima aktivirane protein kinaze, o ciklinima ovisne protein kinaze, kazein kinaza II, fosforilaza II, kinaza ovisna o cAMP)²¹¹⁻²²⁴ a s druge strane isti učinak može imati i nedostatak ili smanjena aktivnost fosfataza (u AB opisane smanjene razine fosfataze 1, 2A, 2B i 2C).²²⁵⁻²³²

Od pojave prvih blago promijenjenih neurona uslijed hiperfosforilacije pa do nastanka izraženih neurofibrilarnih promjena i simptoma demencije potrebno je otprilike 20-30 godina. Hiperfosforilirani tau proteini akumuliraju se u neuronima i glija stanicama na način specifičan za određenu neurodegenerativnu bolest. Nakon izvršene elektroforeze homogenizata moždanog tkiva, podjednaka količina 3R i 4R tau izooblika nađe se u AB, Down sindromu te u nekim obiteljima s frontotemporalnom demencijom s parkinsonizmom zbog mutacije *MAPT* gena na 17. kromosomu (FTDP-17). 3R oblici tau proteina prevladavaju nad 4R oblicima u Pickovoj bolesti (koja se danas smatra samo jednom podvrstom frontotemporalne demencije), dok 4R oblici prevladavaju u progresivnoj supranuklearnoj kljenuti, kortikobazalnoj degeneraciji, i u nekih obitelji s FTDP-17. Iako za sada nije moguće samo analizom elektroforetskog profila tau proteina iz likvora utvrditi o kojoj se točno neurodegenerativnoj bolesti radi (osim možda u slučaju Pickove bolesti), kako tau patologija ima ogromnu važnost u njihovoj patogenezi, napose AB (koja je najčešća sekundarna tauopatija), smatra se da bi se detaljnijom analizom tau proteina moglo dobiti ključne uvide u nastanak, a možda i liječenje i sprječavanje navedenih bolesti.¹⁷⁶

1.3. Biološki biljezi u dijagnostici demencija

1.3.1. Dijagnostički biljezi AB

Dijagnostički biljezi AB mogu se podijeliti u biljege stanja (*state markers*) i biljege stadija (*stage markers*). Biljezi stanja odražavaju intenzitet same bolesti, a možda najbolji primjer takvoga biljega je ukupni tau protein, pri čemu koncentracija ukupnog tau proteina u likvoru pokazuje ukupni stupanj oštećenja neurona. Biljezi stadija odražavaju uznapredovalost degenerativnih promjena kao što je npr. atrofija

hipokampusa, a primjer takvih biljega su neuroradiološke tehnike snimanja mozga, npr. CT ili MR, te kliničke ocjenske ljestvice kojima se procjenjuje stupanj kognitivnog propadanja.²³³

1.3.2. Tau proteini u likvoru

Normalna koncentracija tau proteina u likvoru uobičajeno se vidi je u nekoliko značajnih stanja koja su važna u diferencijalnoj dijagnozi demencije, npr. depresiji, demenciji zbog alkoholizma te u nekih kroničnim neurološkim bolestima poput Parkinsonove bolesti i progresivne supranuklearne paralize,²³⁴⁻²³⁷ dok su povišene koncentracije ukupnog tau proteina u AB do sada opisane u mnogobrojnim studijama: uobičajeno je koncentracija tau proteina u likvoru i do tri puta viša u AB nego u zdravih kontrolnih ispitanika.^{233, 238-241} Nažalost, specifičnost tau proteina u definiranju bolesnika s AB nije idealna, s obzirom da su visoke koncentracije tau proteina pronađene i u nekim drugim stanjima koja dovode do demencije, kao što su VaD, CJB, FTD. U nekim studijama nađena je visoka koncentracija tau proteina u velikom postotku bolesnika s VaD^{236,237,242}, dok je u drugim studijama nađena visoka koncentracija tau proteina samo u nekolicine takvih bolesnika.²⁴³⁻²⁴⁵ Navedeni se rezultati mogu objasniti mogućom prisutnošću pridružene patologije AB, što je relativno čest nalaz prilikom neuropatološke analize nakon obdukcije.^{245,246} Neke studije također su opisale visoke koncentracije ukupnog tau proteina u pojedinim bolesnika s FTD^{236,247}, dok u drugima nisu bile povišene.^{248,249}

1.4.3. Fosforilirani tau protein u likvoru

Danas se već i komercijalno dostupnim ELISA kitovima može izmjeriti koncentracija fosforiliranog tau (p-tau) proteina u likvoru bolesnika s demencijom, a u brojnim objavljenim studijama koje su određivale razine p-tau na epitopima treonin 181, serin 199 i treonin 231 opisani su slični rezultati.²³³ U jednome od navedenih istraživanja, p-tau proteini su sa specifičnošću od 92% razlikovali AB od normalnog starenja, dok im je osjetljivost bila oko 80% i varirala od studije do studije ovisno o korištenoj ELISA metodologiji.²³³ Osim u AB, p-tau protein nakuplja se i u tridesetak drugih neurodegenerativnih bolesti, među kojima se ističu odrasli bolesnici s Down sindromom, parkinsonizam-demencija s Guama, demencija s argirofilnim zrcima (Brakova bolest), FTD, kortikobazalna degeneracija, palido-ponto-nigralna

degeneracija, demencija boksača, progresivna supranuklearna paraliza i Gerstmann-Sträussler-Scheinkerova bolest.²⁵⁰

Prema rezultatima dosadašnjih studija, razina p-tau proteina u likvoru relativno dobro korelira s MCI te neurofibrilarnom patologijom AB.²⁵¹⁻²⁵³ Osim toga, i ukupni tau i p-tau pokazali su se kao dobri predskazatelji kognitivnog propadanja u različitim stadijima AB.²⁵⁴⁻²⁵⁶ Obzirom da VaD nije karakterizirana nastankom neurofibrilarnih snopića kao što je to slučaj u AB, te zbog činjenice da se biokemijske promjene u mozgu odražavaju u likvoru, p-tau proteini mogli bi biti novi i vrijedan biološki biljeg koji bi pomogao razlikovanju AB i VaD.²⁵³

1.3.3. Značaj bioloških biljega u diferencijalnoj dijagnostici AB i VaD

Usprkos kliničkom pregledu, neuroradiološkoj obradi i neuropsihološkim testovima za određivanje kognitivnih deficita, na temelju danas dostupnih kriterija još je uvijek vrlo teško razlikovati AB i VaD u ranim stadijima bolesti. Budući da već u prodromalnom (prekliničkom) stadiju AB dolazi do nakupljanja senilnih plakova i neurofibrilarnih snopića čak i 10-20 godina prije kognitivnih promjena, to je stanje na mnogo načina slično kardiovaskularnim bolestima u kojima aterosklerotski procesi počinju puno prije nastupa samog srčanog ili moždanog udara.²⁵⁷ S druge strane, postoji opasnost predimenzioniranja u dijagnostici VaD ukoliko bi se postavljanje te dijagnoze temeljilo samo na neuroradiološkoj obradi mozga, obzirom na neuropatološke nalaze definitivne AB s vaskularnim oštećenjima, kao i na tzv. miješanu demenciju u kojoj se klinički i neuropatološki isprepliću AB i VaD. Idealno bi bilo pronaći biološki biljeg (ili, vjerojatnije, kombinaciju bioloških biljega) čija bi točnost bila najbliža "zlatnom standardu", odnosno patohistološkom obducijskom nalazu.²⁵⁷

2. HIPOTEZA

Vrijednost ukupnih tau proteina (t-tau) te tau proteina fosforiliranih na treoninu 181 (p-tau181), serinu 199 (p-tau199) i treoninu 231 (p-tau231) iz likvora su dovoljno specifični (>85%) i osjetljivi (>85%) biološki biljezi za dijagnostičko razlikovanje AB i VaD.

3. CILJEVI RADA

3.1. Opći cilj

Opći cilj ovog istraživanja bio je određivanjem vrijednosti tau proteina u likvoru doprinijeti ranijem i točnijem razlikovanju AB i VaD.

3.2. Specifični ciljevi

Specifični ciljevi bili su:

1) procijeniti osjetljivost i specifičnost koncentracija ukupnog tau, p-tau181 i p-tau199 iz likvora u razlučivanju ispitanika s AB i VaD podudarnih dobnih skupina,

2) procijeniti imaju li kombinacije pojedinih markera (npr. omjeri p-tau181 / ukupni tau odnosno p-tau199 / ukupni tau) iz likvora imaju veću točnost u razlikovanju ispitanika s AB i ispitanika s VaD,

3) procijeniti osjetljivost i specifičnost koncentracija ukupnog tau, p-tau181 i p-tau199 iz likvora, te njihovih kombinacija (npr. omjera p-tau181/ukupni tau i p-tau199 / ukupni tau) u razlučivanju zdravih kontrola u odnosu na ispitanike s postavljenom kliničkom dijagnozom AB, odnosno VaD podudarnih dobnih skupina.

4. MATERIJALI I METODE

4.1. Uključni kriteriji i kriteriji neuključivanja

U ispitivanje je ukupno bilo uključeno 202 bolesnika, od toga 152 bolesnika sa AB, 18 zdravih kontrolnih ispitanika (KONT), 28 bolesnika s VaD te 4 bolesnika s miješanom demencijom (VaD i AB). Uključeni bolesnici ranije nisu liječeni antidementivima.

Kod svih ispitanika su uključni kriteriji bili: životna dob 50 do 90 godina, anamnestički podaci suspektni na razvoj demencije, uredan neurološki status ili prisutnost žarišnog piramidnog ili cerebelarnog odstupanja, broj MMSE bodova 15-27 (uz koreciju MMSE prema dobi i edukaciji), neuropsihološko testiranje suspektno na sindrom demencije tipa AB ili VaD, uredan nalaz vitamina B12, folne kiseline, trijotironina (T3), tiroksina (T4) i tireotropina (*thyroid-stimulating hormone*, TSH), CT/MR mozga koji govori za atrofiju mozga ili vaskularne lezije mozga te uredan nalaz likvora. Kriteriji neuključivanja bili su: dob veća 90 godina, odnosno ispod 50 godina starosti, patološki nalaz vitamina B12, folne kiseline, T3, T4 i TSH (zbog mogućeg metaboličkog uzroka demencije), uredan neuroradiološki nalaz ili neuroradiološki nalaz neke druge patologije, neuropsihološko testiranje koje ukazuje da se radi o osobama s teškom demencijom (MMSE <15) ili uredne kognicije (MMSE >27) ili da se radi o pseudemenciji odnosno nekom drugom obliku demencije te patološki nalaz likvora koji ukazuje na prisutnost infekcije SŽS-a ili na demijelinizacijsku bolest. Nakon toga, ovisno o broju bodova prema HIS ljestvici bolesnici su podijeljeni u slijedeće skupine: vjerojatna Alzheimerova bolest (ispitanici koji na ljestvici imaju 4 boda ili manje i vjerojatna vaskularna demencija (ispitanici koji na ljestvici imaju od 7-18 bodova). Bolesnici koji su zadovoljili gore navedene uključne kriterije, zamoljeni su potpisati Informirani pristak koji uključuje i pristanak na lumbalnu punkciju, kako bi se iz likvora mogli odrediti navedeni biološki biljezi. Svi bolesnici, odnosno njihove obitelji, bili su upoznati sa svrhom istraživanja te su dobili „Obavijest za ispitanika“ u kojoj je detaljno opisan način izvođenja lumbalne punkcije, kao i moguće komplikacije tog postupka. Kontrolna skupina bolesnika koja je zamoljena da sudjeluju u istraživanju bila je urednog kognitivnog statusa mjereno

MMSE ljestvicom. Kod tih je bolesnika lumbalna punkcija iz medicinskih razloga rađena zbog sumnje na polineuropatiju bilo koje etiologije ili zbog sumnje na bolest motornog neurona, a uz njihova dopuštenje je uzeto i 2 ml likvora za ovo istraživanje. I oni su potpisali „Obavijest za ispitanika“ iako su prije hospitalizacije na neurološkom odjelu potpisali pristanak za sve potrebne dijagnostičke procedure za vrijeme hospitalizacije. Nakon potpisane „Obavijesti za ispitanika“, s bolesnicima je dogovoreno promatranje na Neurološkom odjelu Opće bolnice u Varaždinu, gdje je lumbalnom punkcijom izuzeto 2 ml likvora koji je nakon toga pohranjen, transportiran i obrađen u Hrvatskom institutu za istraživanje mozga Medicinskog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu, Šalata 12.

4.2. Korišteni ELISA testovi

Kako bi se odredila koncentracija pojedinih bioloških biljega u likvoru, korišteni su komercijalno dostupni kitovi za enzimski povezanu imunoapsorpcijsku analizu (ELISA, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*). Za potrebe ovog istraživanja kod određivanja ukupne koncentracije proteina tau korišten je ELISA kit human Tau Ag Fujirebio (Ghent, Belgia) kojim je određivana koncentracija ukupnog tau proteina tj. svih šest njegovih izooblika u mozgu. Za određivanje koncentracije fosforiliranog tau proteina na epitopu serin 199 (p-tau-199) korišten je ELISA kit proizvođača Invitrogen (Camarillo, CA, S.A.D.). Za određivanje koncentracije tau proteina fosforiliranog na treoninu 181 (p-tau-181) korišten je ELISA kit Innotest Phospho-Tau proizvođača Innogenetics (Ghent, Belgija). Za provođenje ELISA analize korišten je ELISA čitač model BIORAD 680 (Bio-rad laboratories, Hercules, CA, S.A.D.). Protokol uzimanja likvora bio je u potpunosti standardiziran (to je izuzetno važno za vjerodostojnost rezultata). Lumbalna punkcija se izvodila u jutarnim satima, između 8 i 10 h, tako da je likvor izuzet između L₃-L₄ ili L₄-L₅ intervertebralnog prostora. Nakon što je ispušteno prvih 20 kapi (za osnovnu analizu), uzeto je 2 ml likvora u polipropilenske tube za sakupljanje likvora. Ako je eventualno došlo do traumatske punkcije sa hemoragizacijom likvora, ti su uzorci isključeni iz daljnjih analiza. Likvori su čuvani na 4°C stupnjeva, umotani u aluminijsku foliju, te u zatvorenoj posudi s ledom transportirani do laboratorija. Likvor je u laboratoriju centrifugiran 10 minuta na 2000 g na kontroliranoj sobnoj temperaturi, a kako bi se isključile stanice i drugi netopljivi materijal. Preostala količina likvora čuvana je na temperaturi od -80°C do određivanja bioloških biljega. Samo određivanje razina pojedinih biomarkera u likvoru provođeno je striktno prema detaljnim uputama proizvođača, uz najmanje dvije interne kontrole uzoraka kako bi se verificirala konzistentnost rezultata. Ukoliko bi se rezultati internih kontrola za bilo koji ispitivani biološki biljeg razlikovali više od 20%, mjerenje je ponovljeno, pa ako je ista razlika ustanovljena i nakon ponovljenog mjerenja, takav je uzorak izuzet iz daljnje obrade.

5. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

U obradi dobivenih rezultata korištene su sljedeće statističke metode i testovi: 1) Faktorski skor, 2) t-test i jednostruka analiza varijance (ANOVA), 3) Kruskal-Wallis test (kad nisu bile zadovoljene pretpostavke za izvođenje jednosmjerne analize varijance), 4) Mann-Whitney test (kao neparametrijska alternativa t-testu za neovisne uzorke), 5) Kolmogorov-Smirnovljev test s Bonferronijevom korekcijom kod višestrukih usporedbi, 6) analiza krivulje osjetljivosti dijagnostičkog testa (Receiver-Operating characteristic, ROC), 7) Pearsonov koeficijent korelacije (kada je postojala linearna povezanost i neprekidna normalna distribucija promatranih varijabli), 8) Spearmannov koeficijent korelacije (kada nije bilo moguće primijeniti Pearsonov koeficijent korelacije).

Klinički parametri (broj MMSE bodova, dob bolesnika i trajanje bolesti), kao i koncentracije triju markera iz likvora (t-tau, p-tau181 i p-tau199) su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija (SD) uz raspon, te pomoću medijana, 25. i 75. percentile i interkvartilnog raspona. Kolmogorov-Smirnov test (uz Bonferronijevu korekciju) korišten je za utvrđivanje normalnosti raspodjele pojedinih parametara (demografskih, kliničkih, laboratorijskih). Korišten je također i faktorski skor kao metoda multidimenzionalne analize kojom se opisuje međusobna povezanost većeg broja promijenjivih izvornih varijabli pomoću manjeg broja zajedničkih faktora ili pomoću jedne varijable koja ih bolje opisuje, odnosno bolje objašnjava njihovu međusobnu povezanost.

Za usporedbu vrijednosti demografskih, kliničkih i laboratorijskih parametara između proučavanih skupina korišten je neparametrijski Kruskal-Wallis test, nakon kojeg je u slučaju dobivene značajne povezanosti između pojedinih skupina učinjen Mann-Whitney U-test za usporedbu parova. Kada je to bilo moguće, za usporedbe je također korišten i t-test, a dobiveni rezultati uspoređeni s rezultatima Mann-Whitney U-testa.

Analiza ROC krivulje (grafički prikaz pomoću kojega se na x-osi nalazi odnos lažno-pozitivnih rezultata (1-specifičnost), a na y-osi odnos stvarno-pozitivnih rezultata (osjetljivost) za različite mogućnosti graničnih (*cut-off*) vrijednosti određenog biomarkera ili kombinacije biomarkera korištena je za procjenu dijagnostičke vrijednosti parametara iz likvora u razlikovanju ispitivanih skupina.

Granične vrijednosti pojedinog biološkog biljega iz likvora definirane su kao vrijednosti na ROC krivulji u kojima je umnožak osjetljivosti i specifičnosti dosegla maksimum. Dodatno je određivana i specifičnost markera u razlikovanju između skupina, pri čemu je osjetljivost uvijek bila postavljena na 85% (ili više).

Osjetljivost i specifičnost su prikazane uz interval pouzdanosti (*confidence interval*, CI) od 95%. Dodatno je prikazana i površina ispod ROC krivulje (*area under curve*, AUC) kao indikator točnosti rezultata. Korelacija između pojedinih kliničkih parametara te vrijednosti markera iz likvora je analizirana upotrebom Spearmanovog testa (r) ili Pearsonovog koeficijenta korelacije (r_s).

6. REZULTATI

6.1. Demografski podaci i vrijednosti ukupnog tau, p-tau181 i p-tau199 u likvoru oboljelih od AB, VaD, AB+VaD i zdravih kontrolnih ispitanika

Klinički parametri dobi, spola, broja MMSE bodova te koncentracija triju markera iz likvora (t-tau, p-tau181 i p-tau199) prikazani su kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija (SD), medijan te 25. i 75. percentile u **Tablici 1**.

Dodatno je u **Tablici 1** naveden i faktorski skor. Uz pomoć te multidimenzionalne analize korištena je mogućnost kombiniranja većeg broja međusobno povezanih izvornih varijabli (vrijednosti ukupni tau, p-tau181 i p-tau199) u jednu zajedničku varijablu koja ih bolje opisuje, odnosno bolje objašnjava njihovu međusobnu povezanost. Usporedba vrijednosti između skupina u odnosu na broj MMSE bodova, vrijednosti ukupnog tau proteina, p-tau181 i p-tau199 učinjena je Kolmogorov – Smirnovljevim testom normalnosti, a rezultati te analize su prikazani u **Tablici 2**.

Tablica 1. Demografski podaci i vrijednosti bioloških biljega.

Grupa (broj ispitanika)	Ukupni tau (pg/ml)		p-tau181 (pg/ml)		p-tau199 (pg/ml)		Faktorski skor (ukupni tau, p-tau181, p-tau199)		Dob Srednja vrijednost ± SD	Spol Ž vs M	MMSE Srednja vrijednost ± SD
	Srednja vrijednost ± SD	Medijan (25-75. percentila)	Srednja vrijednost ± SD	Medijan (25-75. percentila)	Srednja vrijednost ± SD	Medijan (25-75. percentila)	Srednja vrijednost ± SD	Medijan (25-75. percentila)			
AB (152)	532.4 ± 377.1	439.3 (257.3 – 666.6)	79.7 ± 47.3	68.6 (52.4 – 94.7)	4.557 ± 3.987	3.594 (1.875 – 6.367)	0.0935 ± 1.0061	-0.2078 (-0.6361 – 0.6702)	71 ± 8.0	83 vs. 69	20.4 ± 4.4
KONT (18)	271.4 ± 265.9	185.1 (83.5 – 334.0)	37.5 ± 22.4	30.9 (17.0 – 56.8)	2.365 ± 1.640	2.383 (0.984 – 3.188)	-0.7637 ± 0.4600	-0.7601 (-1.0354 - -0.6461)	59 ± 14.8	8 vs. 10	28.5 ± 1.8
VaD (28)	505.1 ± 314.1	429.8 (237.5–692.0)	69.2 ± 43.4	50.9 (39.1–93.2)	4.227 ± 4.459	2.657 (1.389–5.763)	-0.0502 ± 1.0466	-0.3379 (-0.7615 – 0.5082)	70 ± 9.6	15 vs. 13	22.6 ± 4.5
VaD + AD (4)	652.3 ± 402.9	765.5 (228.3 – 963.0)	81.7 ± 27.8	90.6 (53.2 – 101.3)	4.436 ± 3.557	3.950 (1.406 – 7.952)	0.2357 ± 0.9728	0.4485 (-0.7730 – 1.0317)	74 ± 10.3	1 vs. 3	19.3 ± 3.3

AB, ispitanici s Alzheimerovom bolesti; KONT, zdravi kontrolni ispitanici; VaD, ispitanici s vaskularnom demencijom; MMSE, mala ljestvica mentalnog stanja (*Mini-Mental State Examination*); SD, standardna devijacija; Ž, ženski spol, M, muški spol.

Tablica 2. Kolmogorov-Smirnovljev test normalnosti za ukupni tau, p-tau181 i p-tau199.

Skupina (broj ispitanika)	Kolmogorov – Smirnovljev test normalnosti (KS test)					
	ukupni tau	p-tau181	p-tau199	Faktorski skor (t-tau, p-tau181, p-tau199)	MMSE	Dob
AB (152)	p = 0.007*	p = 0.008*	p = 0.004*	p = 0.014*	p = 0.080	p = 0.244
KONT (18)	p = 0.280	p = 0.707	p = 0.904	p = 0.427	p = 0.993	p = 0.249
VaD (28)	p = 0.753	p = 0.125	p = 0.072	p = 0.378	p = 0.403	p = 0.518
VaD + AD (4)	p = 0.952	p = 0.678	p = 0.908	p = 0.961	p = 0.912	p = 0.990

FS, faktorski skor; AB, ispitanici s Alzheimerovom bolesti; KONT, zdravi kontrolni ispitanici; VaD, ispitanici s vaskularnom demencijom; MMSE, broj bodova na mini ljestvici mentalnog stanja (*Mini-Mental State Examination*).

*Nije normalna raspodjela unutar navedenih skupina.

Budući da je Kolmogorov-Smirnovljev test pokazao kako vrijednosti bioloških biljega nemaju normalnu raspodjelu u skupini ispitanika s AB, pored parametrijskih su učinjeni i neparametrijske testovi, kao što je niže prikazano.

Analizirane su sve četiri skupine: skupina ispitanika s AB, skupina ispitanika s , skupina ispitanika s „miješanom demencijom“ (VaD + AB), te skupina zdravih kontrolnih ispitanika (KONT). Zbog višestrukih usporedbi je u daljnjoj analizi uvedena Bonferronijeva korekcija, pri čemu se razina statističke značajnosti podijelila s brojem usporedbi između skupina (za četiri skupine radi se o sveukupno šest usporedbi pa je potrebna razina statističke značajnosti bila $\alpha = 0.05/6$, tj. **0.008**).

6.2. Usporedba vrijednosti ukupnog tau, p-tau181, p-tau199 između četiriju analiziranih skupina (AB, VaD, VaD+AB i KONT)

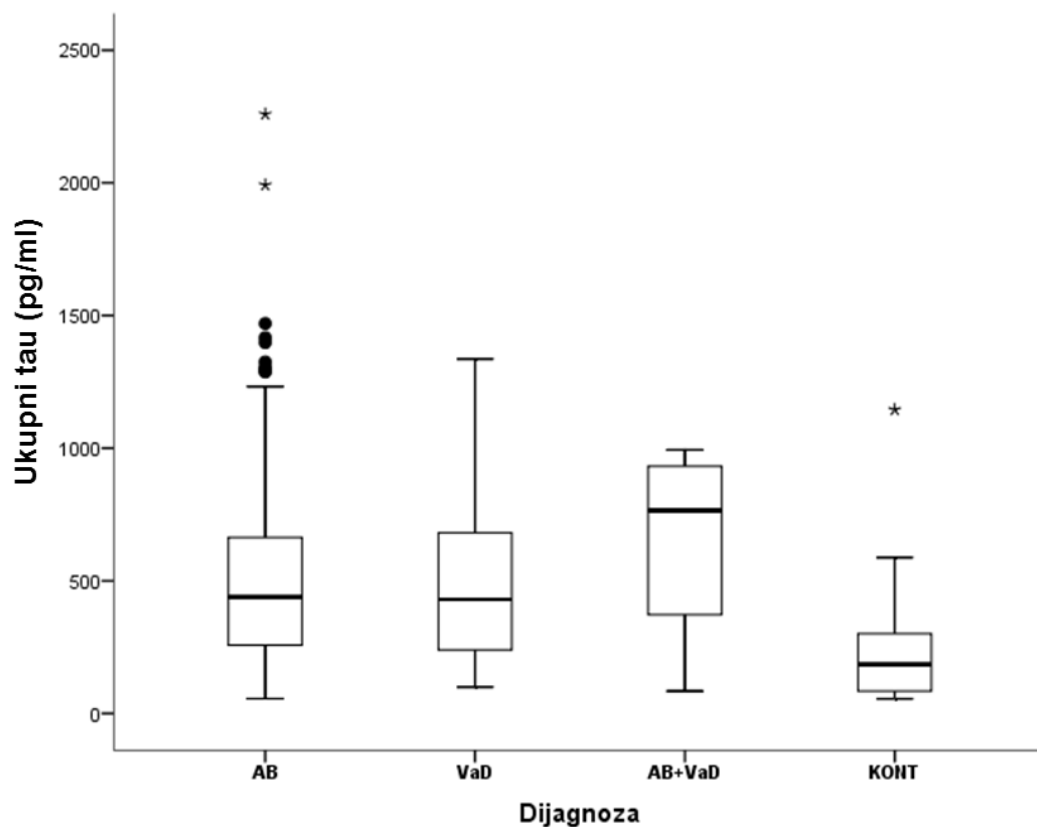
Vrijednosti ukupnog tau su se značajno razlikovale između četiri ispitivane skupine (AB, VaD, VaD+AB i KONT) ($F = 2.855$; st. sl. = 3, 198; $p = 0.038$), ($\chi^2 = 13.873$; st. sl. = 3, $p = 0.003^*$). Usporedba vrijednosti ukupnog tau između pojedinačnih skupina je prikazana u **Tablici 3.** i na **Slici 1.**

Tablica 3. Usporedba vrijednosti ukupnog tau proteina između pojedinih skupina (AB, VaD, VaD+AB i KONT).

Ukupni tau	T-test	Mann-Whitney test
AB vs KONT	(t = 2.752, st. sl.st. sl. = 168, p = 0.007)*	(U = 654, Z = -3.616, p < 0.001) *
AB vs VaD	(t = 0.238, st. sl.st. sl. = 178, p = 0.812)	(U = 2105, Z = -0.091, p = 0.928)
AB vs VaD+AB	(t = -0.674, st. sl.st. sl. = 154, p = 0.501)	(U = 227, Z = -0.863, p = 0.388)
VaD vs KONT	(t = 2.612, st. sl.st. sl. = 44, p = 0.012)*	(U = 124, Z = -2.881, p = 0.004) *
VaD vs VaD + AB	(t = 0.848, st. sl.st. sl. = 30, p = 0.403)	(U = 41, Z = -0.855, p = 0.393)
VaD + AB vs KONT	(t = 2.371, st. sl.st. sl. = 20, p = 0.028)*	(U = 17, Z = -1.617, p = 0.106)

AB, ispitanici s Alzheimerovom bolesti; KONT, zdravi kontrolni ispitanici; VaD, ispitanici s vaskularnom demencijom; VaD + AB, vaskularna demencija + Alzheimerova bolest (miješana demencija).

Plavo su označene vrijednosti za koje je statistička značajnost izgubljena nakon Bonferronijeve korekcije.



Slika 1. Vrijednosti ukupnog tau proteina između pojedinih skupina.

AB, bolesnici s Alzheimerovom bolesti; KONT, zdravi kontrolni ispitanici; VaD, bolesnici s vaskularnom demencijom; VaD + AB, vaskularna demencija + Alzheimerova bolest (miješana demencija). Rezultati su prikazani kao okvir dijagrami gdje bridovi okvira predstavljaju 25. i 75. percentilu, a njihova razlika interkvartilni raspon. Vodoravna crta unutar okvira predstavlja 50. percentilu (medijan). Na slici je crnim kružićem prikazana vrijednost koja odstupa od ostalih podataka u skupini za 1,5 - 3 dužine okvira mjereći od kraja okvira te se naziva blago nepodoban član ili stršalo (mild outlier ili *outlier*). * označava statističku signifikantnost $p < 0,05$.

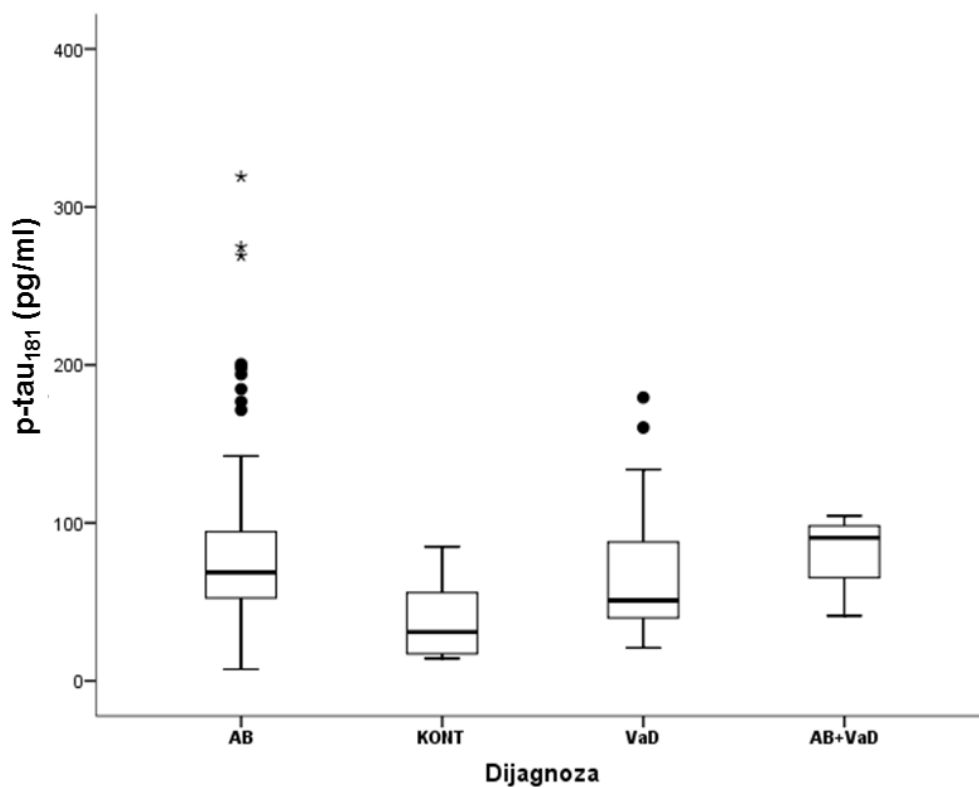
Vrijednosti p-tau181 su se značajno razlikovale između četiri ispitivane skupine (AB, VaD, VaD+AB i KONT) ($F = 4.892$; st. sl. = 3, 198; $p = 0.003$), ($\chi^2 = 22.649$; st. sl. = 3, $p < 0.001^*$). Usporedba vrijednosti p-tau181 između pojedinačnih skupina je prikazana u **Tablici 4.** i na **Slici 2.**

Tablica 4. Usporedba vrijednosti p-tau181 između pojedinih skupina (AB, VaD, VaD + AB i KONT).

p-tau181	T-test	Mann-Whitney test
AB vs KONT	($t = 3.720$, st. sl. = 168, $p < 0.001$)*	($U = 478$, $Z = -4.507$, $p < 0.001$) *
AB vs VaD	($t = 1.092$, st. sl. = 178, $p = 0.276$)	($U = 1700$, $Z = -1.689$, $p = 0.091$)
AB vs VaD + AB	($t = -0.086$, st. sl. = 154, $p = 0.932$)	($U = 246$, $Z = -0.650$, $p = 0.515$)
VaD vs KONT	($t = 3.358$, st. sl. = 44, $p = 0.002$)*	($U = 125$, $Z = -2.858$, $p = 0.004$) *
VaD vs VaD + AB	($t = -0.557$, st. sl. = 30, $p = 0.582$)	($U = 41$, $Z = -0.855$, $p = 0.393$)
VaD + AB vs KONT	($t = 3.425$, st. sl. = 20, $p = 0.003$)*	($U = 7$, $Z = -2.469$, $p = 0.014$) *

AB, bolesnici s Alzheimerovom bolešću; KONT, zdravi kontrolni ispitanici; VaD, bolesnici s vaskularnom demencijom; VaD + AB, vaskularna demencija + Alzheimerova bolest (miješana demencija).

Plavo su označene vrijednosti za koje je statistička značajnost izgubljena nakon Bonferronijeve korekcije.



Slika 2. Vrijednosti p-tau181 između pojedinih skupina.

AB, bolesnici s Alzheimerovom bolesti; KONT, zdravi kontrolni ispitanici; VaD, bolesnici s vaskularnom demencijom; VaD + AB, vaskularna demencija + Alzheimerova bolest (miješana demencija).

Rezultati su prikazani kao okvir dijagrami gdje bridovi okvira predstavljaju 25. i 75. percentilu, a njihova razlika interkvartilni raspon. Vodoravna crta unutar okvira predstavlja 50. percentilu (medijan). Na slici je crnim kružićima prikazana vrijednost koja odstupa od ostalih podataka u skupini za 1,5 - 3 dužine okvira mjereći od kraja okvira te se naziva blago nepodoban član (*mild outlier* ili *outlier*). * označava statističku signifikantnost $p < 0,05$.

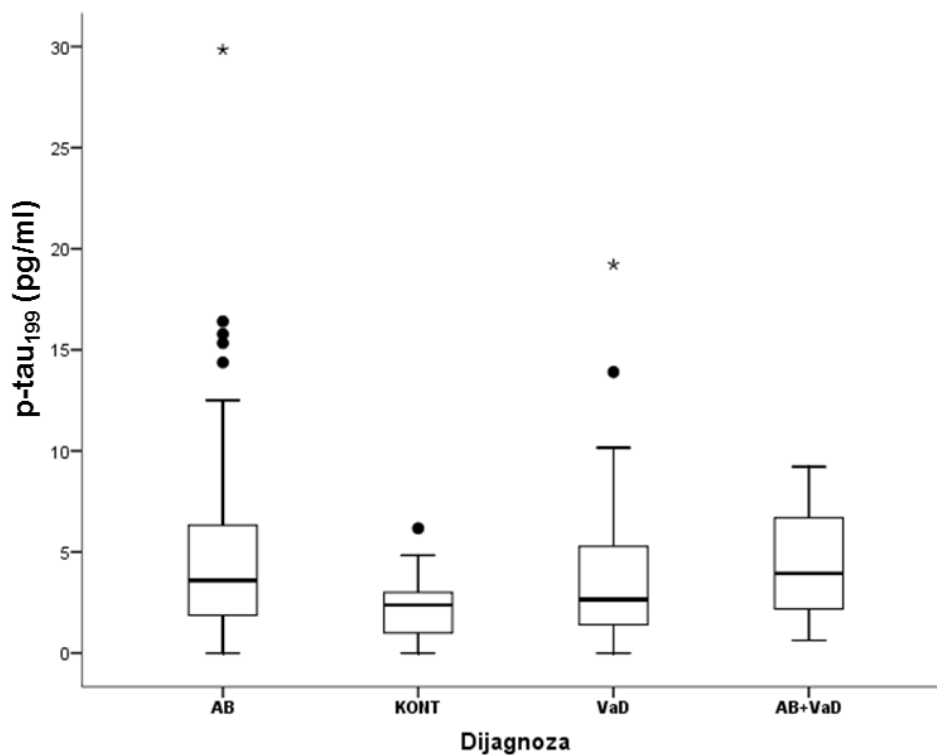
Vrijednosti p-tau199 su se značajno razlikovale između četiri ispitivne skupine (AB, VaD, VaD+AB i KONT) ($F = 1.681$; st. sl. = 3, 198; $p = 0.172$), ($\chi^2 = 7.402$; st. sl. = 3, $p = 0.060$). Usporedba vrijednosti p-tau199 između pojedinačnih skupina je prikazana u **Tablici 5.** i **Slici 3.**

Tablica 5. Usporedba vrijednosti p-tau199 između pojedinih skupina (AB, VaD, VaD +AB i KONT).

p-tau199	T-test	Mann-Whitney test
AB vs KONT	($t = 2.304$, st. sl. = 168, $p = 0.022$) *	($U = 853$, $Z = -2.609$, $p = 0.009$) *
AB vs VaD	($t = 0.393$, st. sl. = 178, $p = 0.695$)	($U = 1840$, $Z = -1.135$, $p = 0.256$)
AB vs VaD+AB	($t = 0.060$, st. sl. = 154, $p = 0.952$)	($U = 292.5$, $Z = -0.129$, $p = 0.897$)
VaD vs KONT	($t = -0.632$, st. sl. = 44, $p = 0.531$)	($U = 201$, $Z = -1.149$, $p = 0.250$)
VaD vs VaD + AB	($t = -0.087$, st. sl. = 30, $p = 0.931$)	($U = 47.5$, $Z = -0.485$, $p = 0.628$)
VaD + AB vs KONT	($t = 1.831$, st. sl. = 20, $p = 0.082$)	($U = 21.5$, $Z = -1.236$, $p = 0.217$)

AB, bolesnici s Alzheimerovom bolesti; KONT, zdravi kontrolni ispitanici; VaD, bolesnici s vaskularnom demencijom; VaD+AB, vaskularna demencija + Alzheimerova bolest (miješana demencija).

Plavo su označene vrijednosti za koje je statistička značajnost izgubljena nakon Bonferronijeve korekcije.



Slika 3. Vrijednosti p-tau199 između pojedinih skupina.

AB, bolesnici s Alzheimerovom bolešću; KONT, zdravi kontrolni ispitanici; VaD, bolesnici s vaskularnom demencijom; VaD + AB, vaskularna demencija + Alzheimerova bolest (miješana demencija).

Rezultati su prikazani kao okvir dijagrami gdje bridovi okvira predstavljaju 25. i 75. percentilu, a njihova razlika interkvartilni raspon. Vodoravna crta unutar okvira predstavlja 50. percentilu (medijan). Na slici je crnim kružićima prikazana vrijednost koja odstupa od ostalih podataka u skupini za 1,5 - 3 dužine okvira mjereći od kraja okvira te se naziva blago nepodoban član (*mild outlier* ili *outlier*). * označava statističku signifikantnost $p < 0,05$.

Vrijednosti dobi su se značajno razlikovale između četiri ispitivne ispitivane skupine (AB, VaD, VaD+AB i KONT) ($F = 8.9$; st. sl. = 3, 197; $p < 0.001$), ($\chi^2 = 12.205$; st. sl. = 3, $p = 0.007$). Vrijednosti dobi između ispitivanih skupina su prikazane u **Tablici 6**.

Tablica 6. Usporedba prosječnih vrijednosti dobi između pojedinih ispitivanih skupina – AB, VaD, VaD + AB i KONT).

DOB	T-test	Mann-Whitney test
AB vs KONT	($t = -0.452$, st. sl. = 167, $p = 0.652$)	($U = 635$, $Z = -3.437$, $p = 0.001$) *
AB vs VaD	($t = 0.810$, st. sl. = 178, $p = 0.419$)	($U = 2035$, $Z = -0.365$, $p = 0.715$)
AB vs VaD+AB	($t = -0.760$, st. sl. = 154, $p = 0.448$)	($U = 253$, $Z = -0.572$, $p = 0.567$)
VaD vs KONT	($t = 2.855$, st. sl. = 43, $p = 0.007$) *	($U = 132$, $Z = -2.484$, $p = 0.013$) *
VaD vs VaD+AB	($t = -0.873$, st. sl. = 30, $p = 0.390$)	($U = 43$, $Z = -0.742$, $p = 0.458$)
VaD+AB vs KONT	($t = 1.882$, st. sl. = 19, $p = 0.075$)	($U = 12.5$, $Z = -1.927$, $p = 0.054$)

AB, bolesnici s Alzheimerovom bolesti; KONT, zdravi kontrolni ispitanici; VaD, bolesnici s vaskularnom demencijom; VaD + AB, vaskularna demencija + Alzheimerova bolest (miješana demencija).

Plavo su označene vrijednosti za koje je statistička značajnost izgubljena nakon Bonferronijeve korekcije.

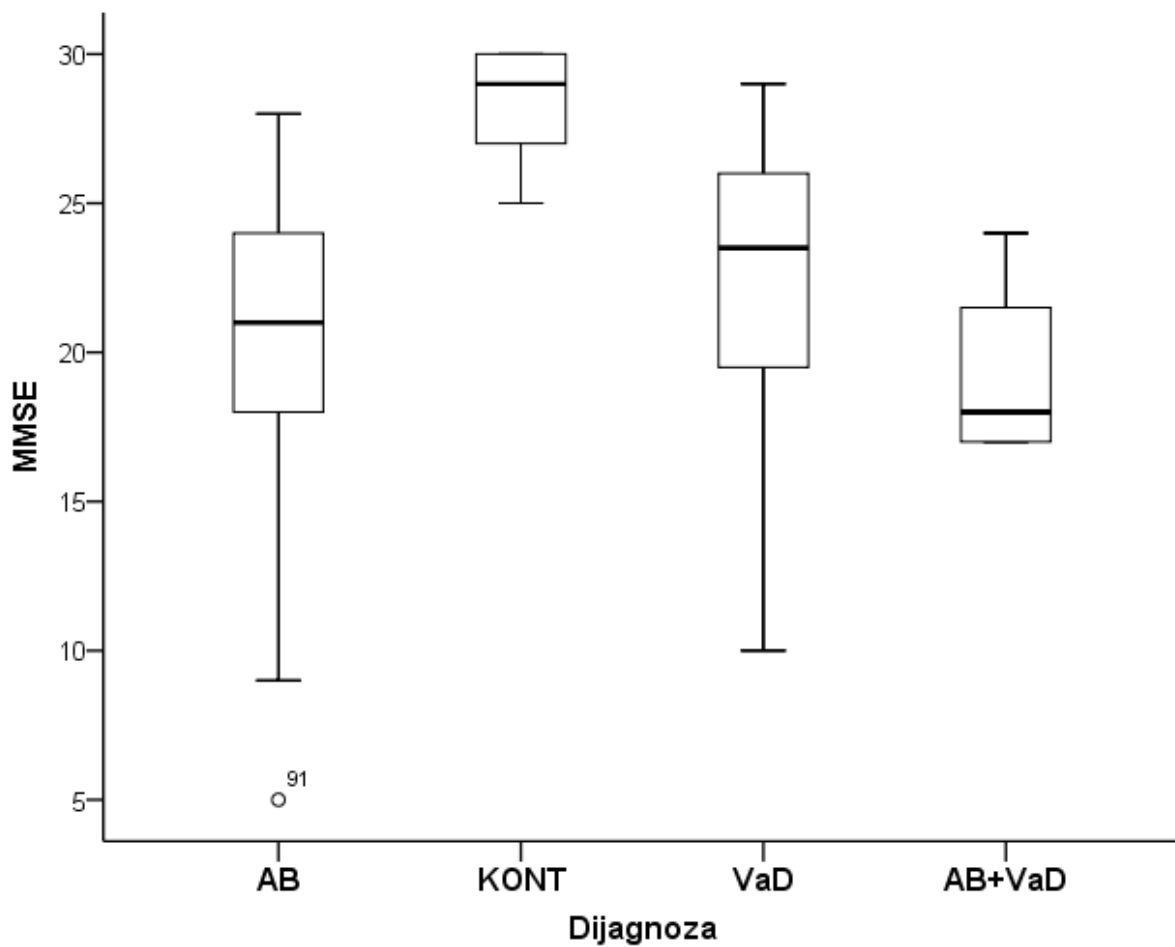
Analiza broja bodova postignutih na MMSE ljestvici (usporedba prosječnih vrijednosti između sve četiri analizirane skupine istovremeno – AB, VaD, VaD+AB i KONT) pokazala je visoki stupanj značajnosti: $F = 17.569$; st. sl. = 3, 193; $p < 0.001$, $\chi^2 = 42.296$; st. sl. = 3, $p < 0.001$. Testiranje razlika u prosječnom broju bodova na MMSE ljestvici između pojedinih ispitivanih skupina prikazano je u **Tablici 7.** i na **Slici 4.**

Tablica 7. Usporedba prosječnog broja bodova na MMSE ljestvici između pojedinih skupina – AB, VaD, VaD + AB i KONT).

MMSE	T-test	Mann-Whitney test
AB vs KONT	($t = -1.204$, st. sl. = 163, $p = 0.230$)	($U = 57.5$, $Z = -6.065$, $p < 0.001$)*
AB vs VaD	($t = -2.456$, st. sl. = 176, $p = 0.015$)*	($U = 1476$, $Z = -2.499$, $p = 0.012$)*
AB vs VaD + AB	($t = 0.501$, st. sl. = 152, $p = 0.617$)	($U = 234.5$, $Z = -0.746$, $p = 0.456$)
VaD vs KONT	($t = -0.109$, st. sl. = 44, $p = 0.914$)	($U = 41$, $Z = -4.334$, $p < 0.001$)*
VaD vs VaD + AB	($t = 1.437$, st. sl. = 30, $p = 0.161$)	($U = 26$, $Z = -1.717$, $p = 0.086$)
VaD + AB vs KONT	($t = -7.527$, st. sl. = 17, $p < 0.001$)*	($U = 0.0$, $Z = -3.086$, $p < 0.001$)*

AB, bolesnici s Alzheimerovom bolesti; KONT, zdravi kontrolni ispitanici; VaD, bolesnici s vaskularnom demencijom; VaD + AB, vaskularna demencija + Alzheimerova bolest (miješana demencija).

Plavo su označene vrijednosti za koje je statistička značajnost izgubljena nakon Bonferronijeve korekcije.



Slika 4. Prosječan broj bodova na MMSE ljestvici po ispitivanim skupinama.

AB, bolesnici s Alzheimerovom bolesti; KONT, zdravi kontrolni ispitanici; VaD, bolesnici s vaskularnom demencijom; VaD + AB, vaskularna demencija + Alzheimerova bolest (miješana demencija). Rezultati su prikazani kao okvir dijagrami gdje bridovi okvira predstavljaju 25. i 75. percentilu, a njihova razlika interkvartilni raspon.

6.3. Usporedba vrijednosti faktorskog skora (ukupni tau, p-tau181 i p-tau199) za skupine ispitanika s AB, VaD, VaD + AB te skupinu zdravih kontrolnih ispitanika

Kada se analizirala vrijednost faktorskog skora dobivenog kombinacijom ukupni tau, p-tau181 i p-tau199 četiriju analiziranih skupina – AB, VaD, VaD + AB i KONT) dobiveni su sljedeći rezultati: $F = 4.236$; st. sl. = 3, 198; $p = 0.006^*$, $\chi^2 = 17.212$; st. sl. = 3, $p = 0.001^*$. To je prikazano u **Tablici 8.** i na **Slici 5.**

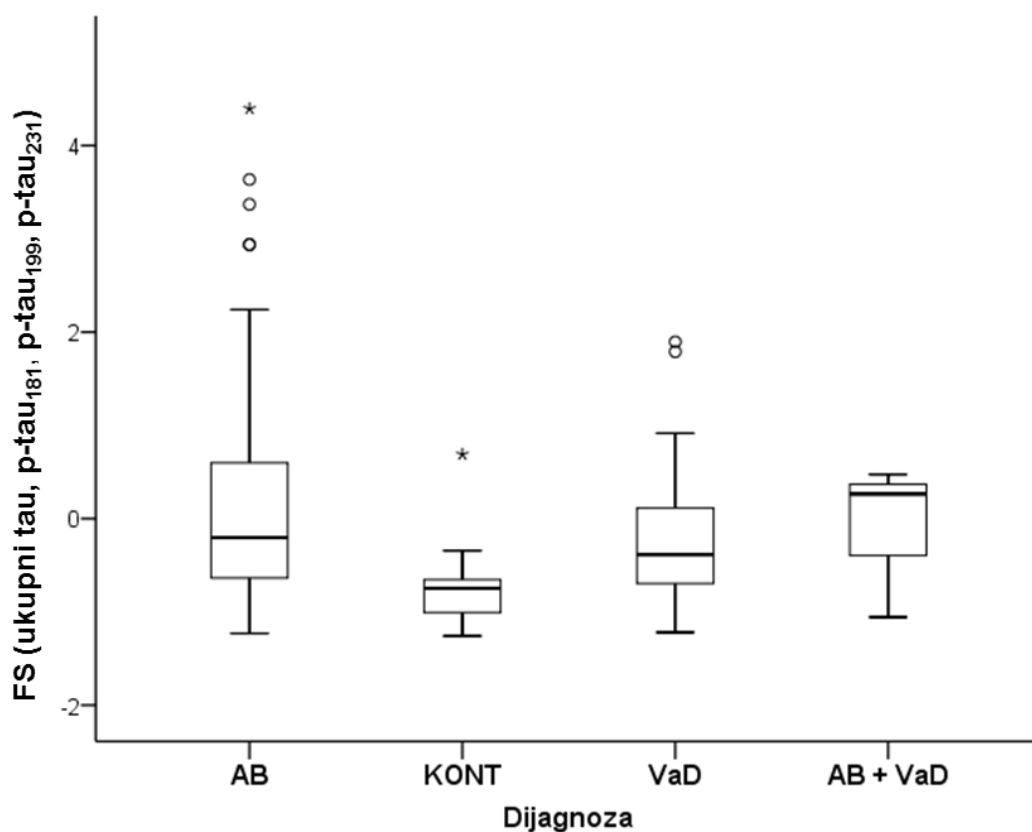
Tablica 8. Faktorski skor između skupina (ukupni tau, p-tau181 i p-tau199 i usporedba izmjerenih vrijednosti između pojedinih skupina AB, VaD, VaD + AB i KONT).

(Kombinacija ukupni tau, p-tau181 i p-tau199)	T-test	Mann-Whitney test
AB vs KONT	($t = 3.564$, st. sl. = 168, $p < 0.001$)*	($U = 558$, $Z = -4.102$, $p < 0.001$) *
AB vs VaD	($t = 0.691$, st. sl. = 178, $p = 0.491$)	($U = 1876$, $Z = -0.995$, $p = 0.320$)
AB vs VaD + AB	($t = -0.279$, st. sl. = 154, $p = 0.780$)	($U = 258$, $Z = -0.516$, $p = 0.606$)
VaD vs KONT	($t = -2.720$, st. sl. = 44, $p = 0.009$)*	($U = 138$, $Z = -2.556$, $p = 0.010$) *
VaD vs VaD + AB	($t = -0.515$, st. sl. = 30, $p = 0.611$)	($U = 43$, $Z = -0.741$, $p = 0.491$)
VaD + AB vs KONT	($t = -3.187$, st. sl. = 20, $p = 0.005$)*	($U = 15$, $Z = -1.778$, $p = 0.081$)

AB, bolesnici s Alzheimerovom bolesti; KONT, zdravi kontrolni ispitanici; VaD, bolesnici s vaskularnom demencijom; VaD + AB, vaskularna demencija + Alzheimerova bolest (miješana demencija).

Plavo su označene vrijednosti za koje je statistička značajnost izgubljena nakon Bonferronijeve korekcije.

Iz tablice je vidljivo da je faktorski skor odnosno kombinacija tau proteina u pojedinim skupinama statistički bila značajno jedino kada je skupina bolesnika s AB promatrana u odnosu na skupinu zdravih kontrolnih ispitanika, što je prikazano i na **Slici 5.**



Slika 5. Faktorski skor (ukupni tau, p-tau181 i p-tau199) te usporedba vrijednosti između pojedinih skupina - AB, VaD, VaD + AB i KONT).

AB, bolesnici s Alzheimerovom bolesti; KONT, zdravi kontrolni ispitanici; VaD, bolesnici s vaskularnom demencijom; VaD + AB, vaskularna demencija + Alzheimerova bolest (miješana demencija). Rezultati su prikazani kao okvir dijagrami gdje bridovi okvira predstavljaju 25. i 75. percentilu, a njihova razlika interkvartilni raspon. Vodoravna crta unutar okvira predstavlja 50. percentilu (medijan). Na slici je crnim kružićima prikazana vrijednost koja odstupa od ostalih podataka u skupini za 1,5 - 3 dužine okvira mjereći od kraja okvira te se naziva blago nepodoban član (*mild outlier* ili *outlier*). * označava statističku značajnost ($p < 0,05$).

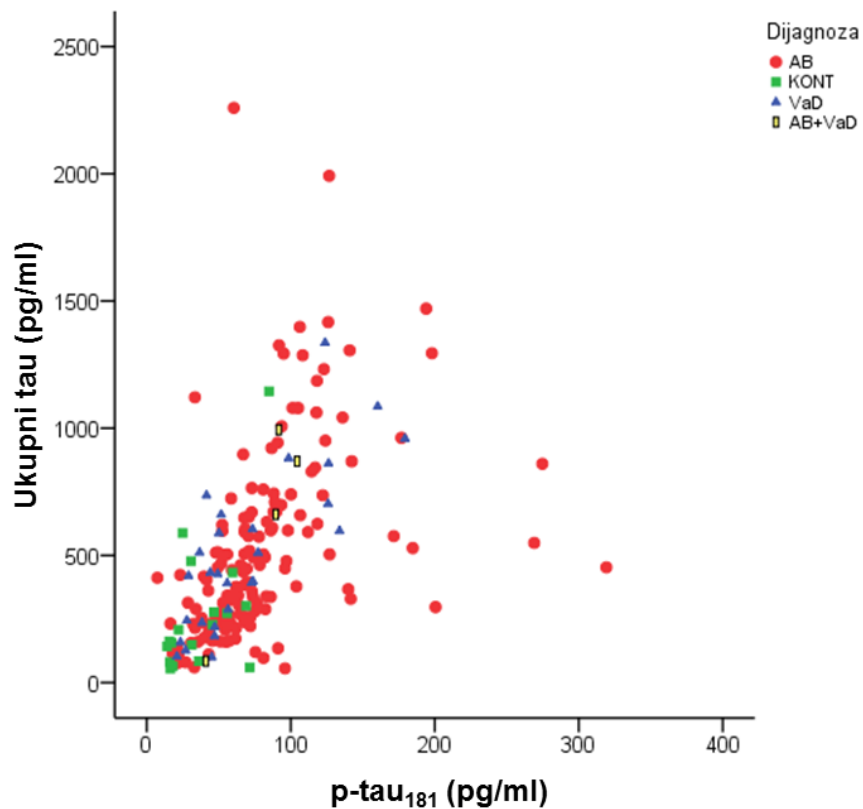
6.4. Korelacije između bioloških biljega

U ovom potpoglavlju promatrali smo korelaciju između pojedinih bioloških biljega, odnosno zavisnost ukupnog tau u odnosu na p-tau181, zavisnost ukupnog tau u odnosu na p-tau199 te međuodnos p-tau181 i p-tau199 (**Tablica 9, Slika 6-8**). Koristeći Pearsonovu korelaciju (r), taj smo međusobni odnos između dviju varijabli grafički prikazali uz pomoć dijagrama raspršenja (*scatterplot diagram*), pri čemu su vrijednosti jedne varijable prikazane na apscisi, a druge na ordinati. Ukoliko nije postojao linearni oblik povezanosti među varijablama, koristili smo Spearmanov koeficijent korelacije (r_s).

Tablica 9. Tablični prikaz korelacije bioloških biljega korištenjem Pearsonove i Spearmanove korelacije uz prethodnu Bonferronijevu korekciju od $\alpha = 0.008$.

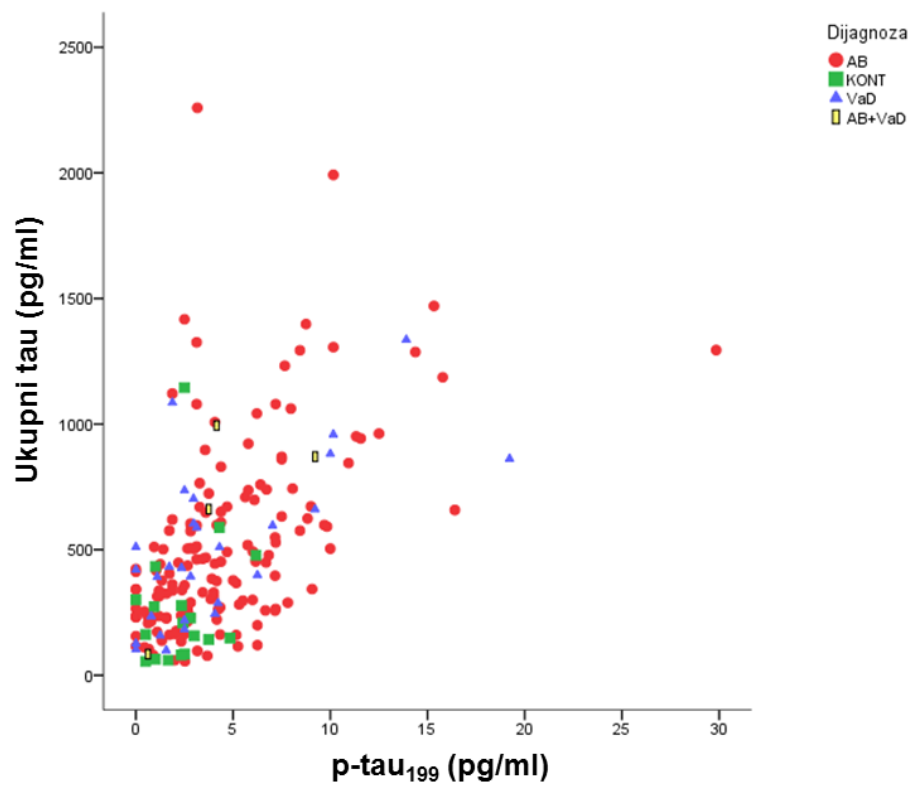
Korelacije bioloških biljega	Ukupni tau vs p-tau181		Ukupni tau vs p-tau199		p-tau181 vs p-tau199	
	Pearsonova korelacija	Spearmanova korelacija	Pearsonova korelacija	Spearmanova korelacija	Pearsonova korelacija	Spearmanova korelacija
Svi ispitanici	($r = 0.515$, st. sl.= 200, $p < 0.001$)*	($r_s = 0.677$, st. sl.= 200, $p < 0.001$)*	($r = 0.549$, st. sl.= 200, $p < 0.001$)*	($r_s = 0.570$, st. sl.= 200, $p < 0.001$)*	($r = 0.587$, st. sl. = 200, $p < 0.001$)*	($r_s = 0.680$, st. sl. = 200, $p < 0.001$)*
AB (152)	($r = 0.446$, st. sl. = 150, $p < 0.001$)*	($r_s = 0.642$, st. sl. = 150, $p < 0.001$)*	($r = 0.529$, st. sl. = 150, $p < 0.001$)*	($r_s = 0.562$, st. sl. = 150, $p < 0.001$)*	($r = 0.583$, st. sl. = 150, $p < 0.001$)*	($r_s = 0.719$, st. sl. = 150, $p < 0.001$)*
KONT (18)	($r = 0.547$, st. sl. = 16, $p = 0.019$)	($r_s = 0.463$, st. sl. = 16, $p = 0.053$)	($r = 0.224$, st. sl. = 16, $p = 0.371$)	($r_s = 0.234$, st. sl. = 16, $p = 0.351$)	($r = -0.239$, st. sl. = 16, $p = 0.340$)	($r_s = -0.119$, st. sl. = 16, $p = 0.639$)
VaD (28)	($r = 0.788$, st. sl. = 26, $p < 0.001$)*	($r_s = 0.725$, st. sl. = 26, $p < 0.001$)*	($r = 0.657$, st. sl.= 26, $p < 0.001$)*	($r_s = 0.612$, st. sl.= 26, $p = 0.001$)*	($r = 0.616$, st. sl.=26, $p < 0.001$)*	($r_s = 0.743$, st. sl. = 26, $p < 0.001$)*
VaD + AD (4)	($r = 0.936$, st. sl.= 2, $p = 0.064$)	($r_s = 0.800$, st. sl.= 2, $p = 0.200$)	($r = 0.722$, st. sl.= 2, $p = 0.278$)	($r_s = 0.800$, st. sl.= 2, $p = 0.200$)	($r = 0.860$, st. sl. = 2, $p = 0.140$)	

AB, bolesnici s Alzheimerovom bolešću; KONT, zdravi kontrolni ispitanici; VaD, bolesnici s vaskularnom demencijom; VaD + AB, vaskularna demencija + Alzheimerova bolest (miješana demencija).



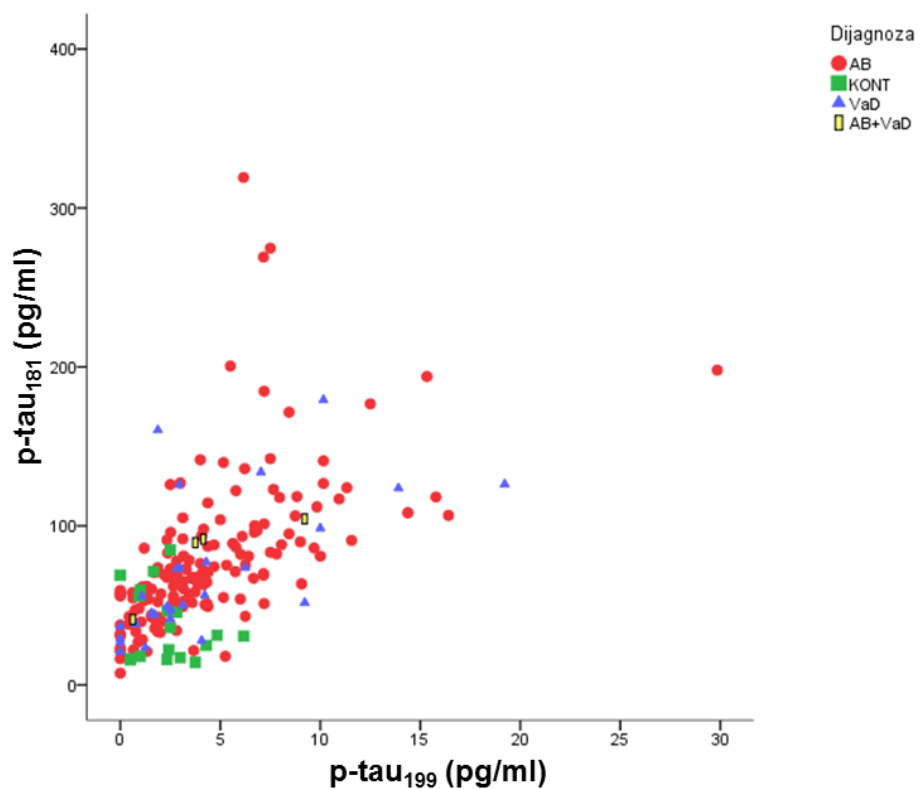
Slika 6. Korelacija ukupnog tau i p-tau181 između skupina ispitanika.

AB, bolesnici s Alzheimerovom bolešću; KONT, zdravi kontrolni ispitanici; VaD, bolesnici s vaskularnom demencijom; VaD + AB, vaskularna demencija + Alzheimerova bolest (miješana demencija).



Slika 7. Korelacija ukupnog tau i p-tau199 između ispitivanih skupina.

AB, bolesnici s Alzheimerovom bolešću; KONT, zdravi kontrolni ispitanici; VaD, bolesnici s vaskularnom demencijom; VaD + AB, vaskularna demencija + Alzheimerova bolest (miješana demencija).



Slika 8. Korelacija p-tau181 i p-tau199 između ispitivanih skupina.

AB, bolesnici s Alzheimerovom bolesti; KONT, zdravi kontrolni ispitanici; VaD, bolesnici s vaskularnom demencijom; VaD + AB, vaskularna demencija + Alzheimerova bolest (miješana demencija).

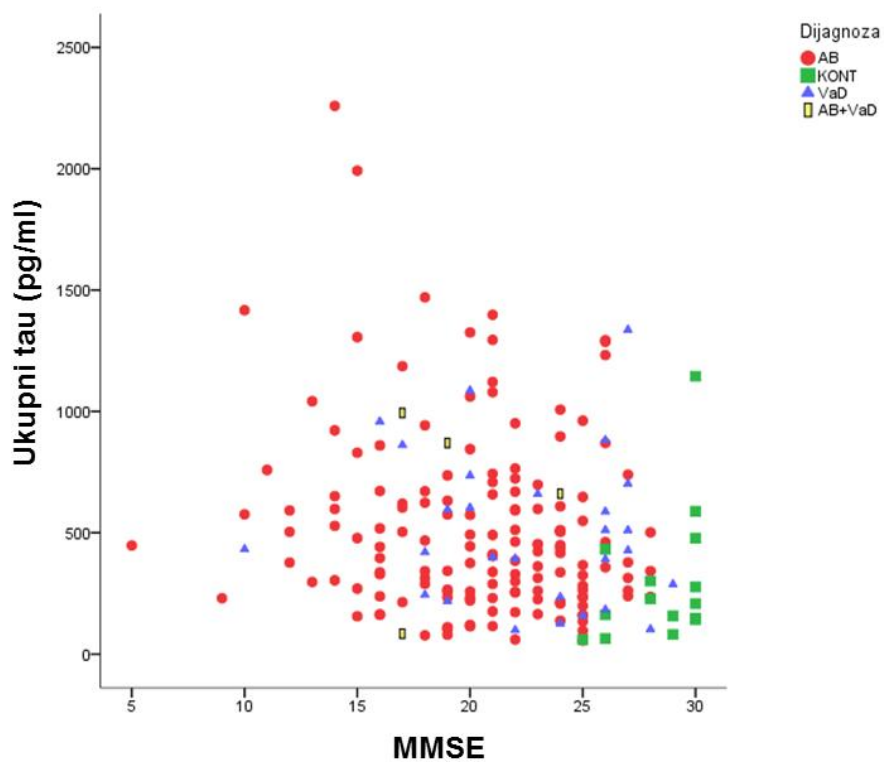
Osim toga, promatrali smo i korelaciju između prosječnog broja bodova na MMSE ljestvici i prosječnih vrijednosti pojedinih bioloških biljega po skupinama, odnosno zavisnost MMSE u odnosu na t-tau, zavisnost MMSE u odnosu na p-tau181 i zavisnost MMSE u odnosu na p-tau199 (**Tablica 10, Slike 9-11**). Za analizu odnosa navedenih varijabli također su korištene i Pearsonov (r) i Spearmanov koeficijent korelacije (r_s).

Tablica 10. Tablični prikaz korelacije MMSE, ukupnog tau, p-tau181 i p-tau199 korištenjem Paersonove (r) i Spearmanove (r_s) korelacije uz prethodnu Bonferronijevu korekciju od $\alpha = 0.008$.

Korelacije MMSE i bioloških biljega	MMSE vs ukupni tau		MMSE vs p-tau181		MMSE vs p-tau199	
	Pearsonova korelacija	Spearmanova korelacija	Pearsonova korelacija	Spearmanova korelacija	Pearsonova korelacija	Spearmanova korelacija
Svi ispitanici (n = 197)	(r = -0.206, st. sl. = 195, p = 0.004)*	(r_s = -0.205, st. sl. = 195, p = 0.004)*	(r = -0.218, st. sl. = 195, p = 0.002)*	(r_s = -0.256, st. sl. = 195, p < 0.001)*	(r = -0.109, st. sl. = 195, p = 0.126)	(r_s = -0.166, st. sl. = 195, p = 0.020)
AB (150)	(r = -0.175, st. sl. = 148, p = 0.032)*	(r = -0.151, st. sl. = 148, p = 0.065)	(r = -0.114, st. sl. = 148, p = 0.163)	(r_s = -0.148, st. sl. = 148, p = 0.071)	(r = -0.049, st. sl. = 148, p = 0.552)	(r_s = -0.116, st. sl. = 148, p = 0.157)
KONT (15)	(r = 0.361, st. sl. = 13, p = 0.186)	(r_s = 0.415, st. sl. = 13, p = 0.124)	(r = -0.202, st. sl. = 13, p = 0.470)	(r_s = -0.098, st. sl. = 13, p = 0.727)	(r = -0.690, st. sl. = 13, p = 0.004)*	(r_s = 0.743, st. sl. = 163, p = 0.002)*
VaD (28)	(r = -0.122, st. sl. = 26, p = 0.538)	(r_s = -0.163, st. sl. = 26, p = 0.408)	(r = -0.190, st. sl. = 26, p = 0.332)	(r_s = -0.075, st. sl. = 26, p = 0.703)	(r = -0.157, st. sl. = 26, p = 0.424)	(r_s = -0.108, st. sl. = 26, p = 0.585)
VaD + AD (4)	(r = 0.124, st. sl. = 2, p = 0.876)	(r_s = -0.105, st. sl. = 2, p = 0.895)	(r = 0.363, st. sl. = 2, p = 0.637)	(r_s = 0.211, st. sl. = 2, p = 0.789)	(r = 0.135, st. sl. = 2, p = 0.865)	(r_s = 0.211, st. sl. = 2, p = 0.789)

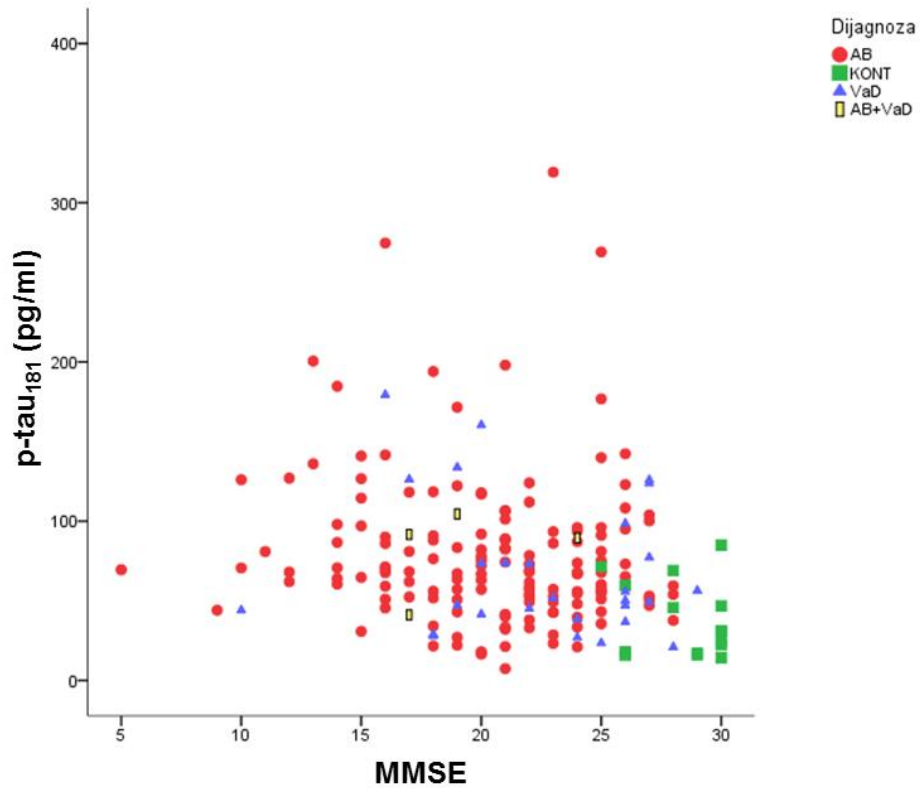
AB, bolesnici s Alzheimerovom bolesti; KONT, zdravi kontrolni ispitanici; VaD, bolesnici s vaskularnom demencijom; VaD + AB, vaskularna demencija + Alzheimerova bolest (miješana demencija).

Plavo su označene vrijednosti za koje je statistička značajnost izgubljena nakon Bonferronijeve korekcije.



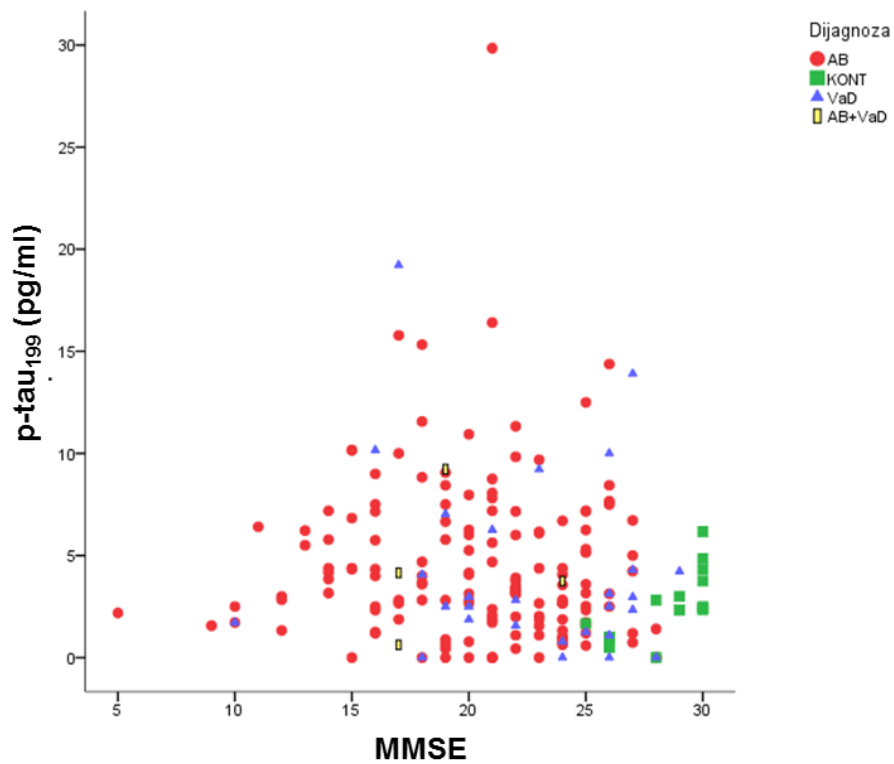
Slika 9. Korelacija ukupnog tau i MMSE između ispitivanih skupina.

AB, bolesnici s Alzheimerovom bolesti; KONT, zdravi kontrolni ispitanici; VaD, ispitanici s vaskularnom demencijom; VaD + AB, vaskularna demencija + Alzheimerova bolest (miješana demencija).



Slika 10. Korelacija p-tau181 i MMSE između ispitivanih skupina.

AB, bolesnici s Alzheimerovom bolesti; KONT, zdravi kontrolni ispitanici; VaD, bolesnici s vaskularnom demencijom; VaD + AB, vaskularna demencija + Alzheimerova bolest (miješana demencija).



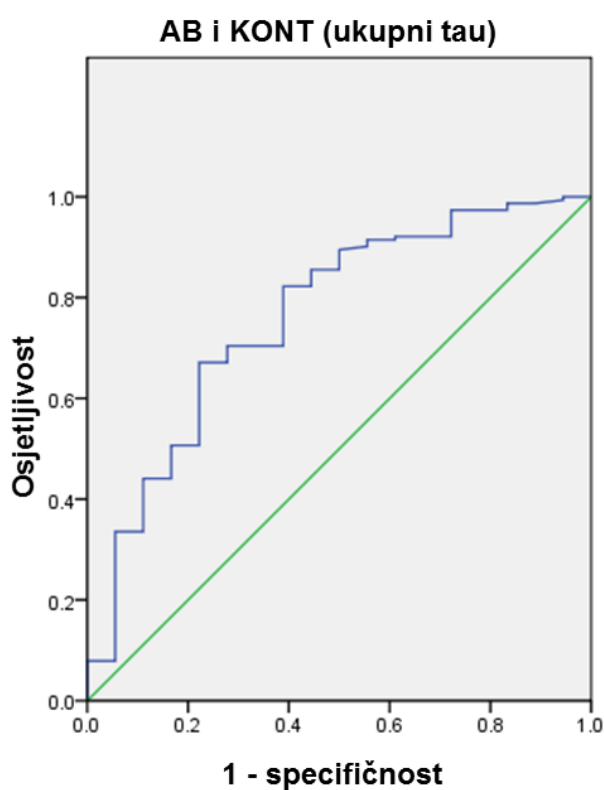
Slika 11. Korelacija p-tau199 i MMSE između ispitivanih skupina.

AB, bolesnici s Alzheimerovom bolešću; KONT, zdravi kontrolni ispitanici; VaD, bolesnici s vaskularnom demencijom; VaD + AB, vaskularna demencija + Alzheimerova bolest (miješana demencija).

6.5. Osjetljivost i specifičnost ispitivanih bioloških biljega

U ovom potpoglavlju smo analizirali osjetljivost i specifičnost bioloških biljega pomoću ROC krivulje.

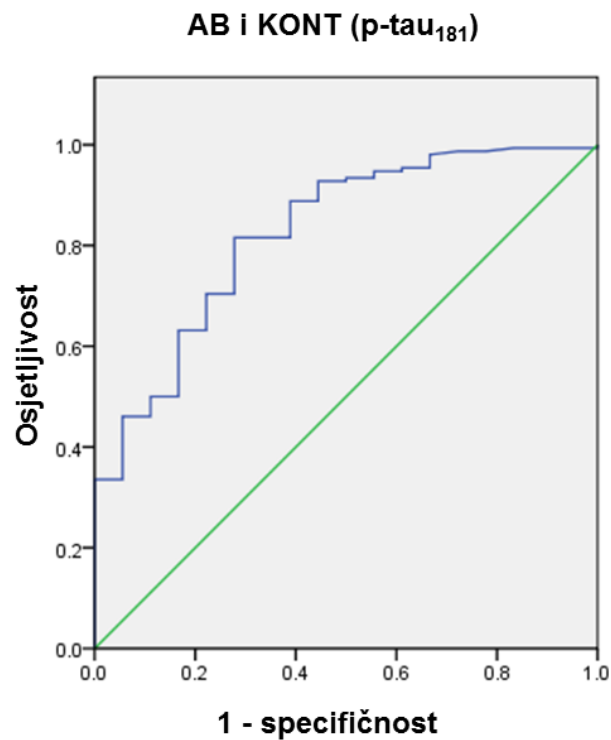
Ukupni tau je razlikovao bolesnike s AB od zdravih kontrolnih ispitanika sa 67.1% osjetljivosti i 77.8% specifičnosti. Izlučna (*cut-off*) vrijednost ukupnog tau je bila 302.5 pg/ml ($-AUC = 0.761$, $p < 0.001$) (**Slika 12**).



Slika 12. Analiza ROC krivulje za ukupni tau između AB i KONT skupine ispitanika.

AB. Bolesnici s Alzheimerovom bolesti, KONT, zdravi kontrolni ispitanici.

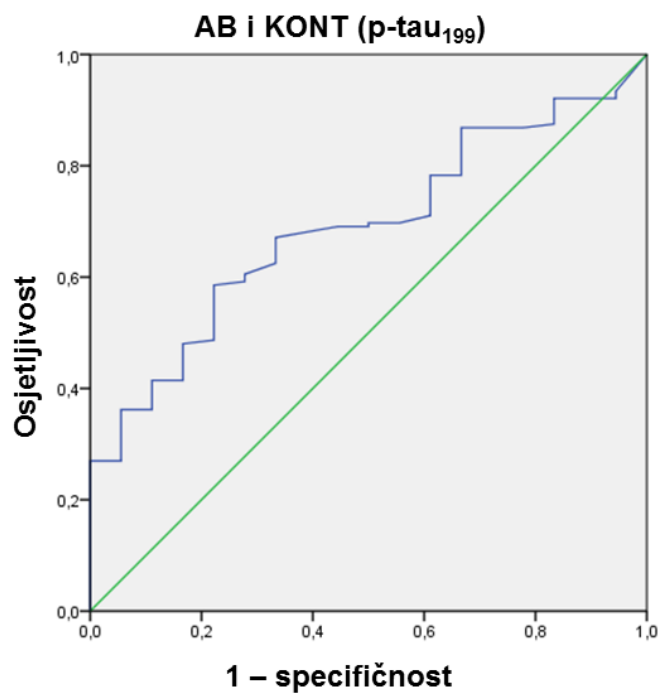
Biološki biljeg p-tau181 je razlikovao bolesnike s AB od zdravih kontrola s 81.6% osjetljivosti i 72.2% specifičnosti. Izlučna vrijednost P-tau181 je bila 46.8 pg/ml (AUC = 0.825, $p < 0.001$) (**Slika 13**).



Slika 13. Analiza ROC krivulje za p-tau181 između AB i KONT skupine ispitanika.

AB, bolesnici s Alzheimerovom bolešću; KONT, zdravi kontrolni ispitanici.

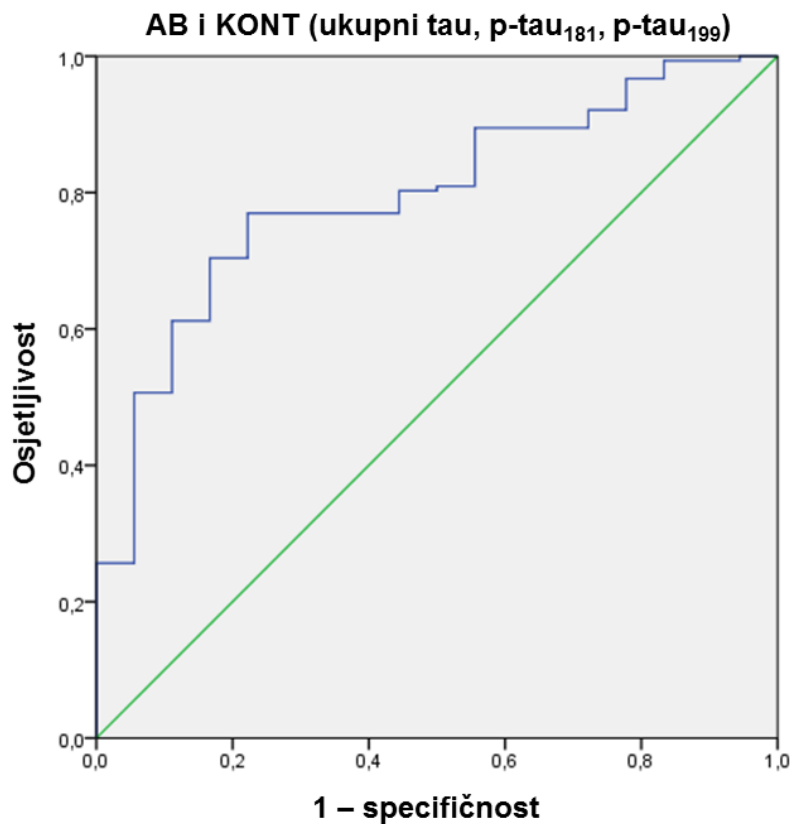
Biološki biljeg p-tau₁₉₉ je razlikovao bolesnike s AB od zdravih kontrola s 58.6% osjetljivosti i 77.8% specifičnosti. Izlučna vrijednost p-tau₁₉₉ je bila 3.063 pg/ml (AUC = 0.688, $p = 0.009$) (**Slika 14**).



Slika 14. Analiza ROC krivulje za p-tau₁₉₉ između AB i KONT skupine ispitanika.

AB, bolesnici s Alzheimerovom bolešću; KONT, zdravi kontrolni ispitanici.

Kada je određen faktorski skor, odnosno kada su se sve tri varijable tau proteina spojile u jednu, dobiveni su sljedeći rezultati: faktorski skor (ukupni tau, p-tau181, p-tau199) je razlikovao bolesnike s AB od zdravih kontrola sa 77% osjetljivosti i 77.8% specifičnosti. Izlučna vrijednost faktorskog skora (ukupni tau, p-tau181, p-tau199) je bila -0.6770133 (AUC = 0.796, $p < 0.001$) (**Slika 15**).

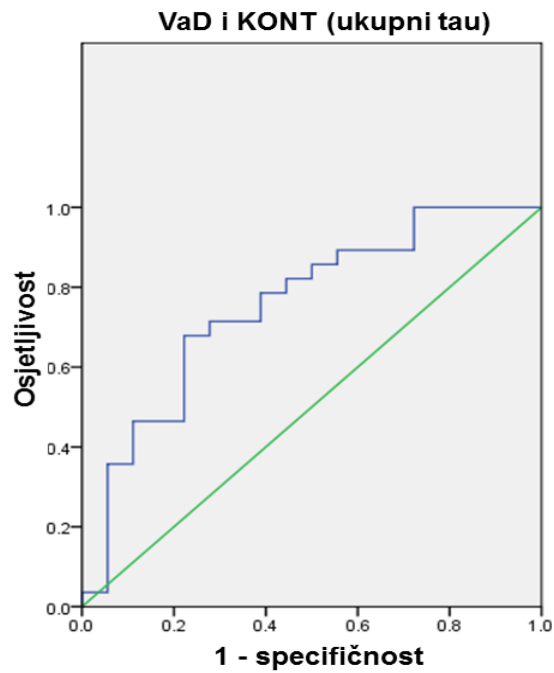


Slika 15. Analiza ROC krivulje za faktorski skor (ukupni tau, p-tau181 i p-tau199) između AB i KONT skupine ispitanika.

AB, bolesnici s Alzheimerovom bolesti; KONT, zdravi kontrolni ispitanici.

Na isti način provedena je analiza ROC krivulje za ispitanike s VaD u odnosu na kontrolne ispitanike.

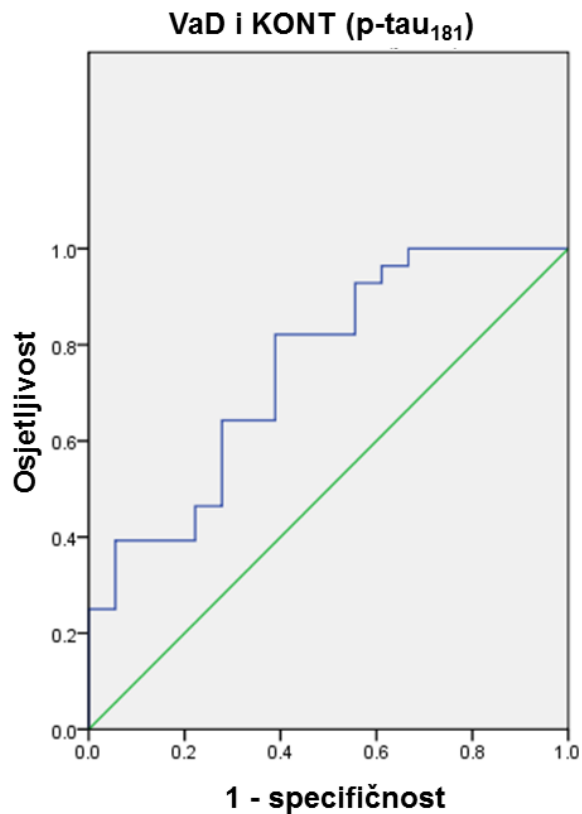
Ukupni tau je razlikovao bolesnike s VaD od zdravih kontrolnih ispitanika sa 67.9% osjetljivosti i 77.8%specifičnosti. Izlučna (*cut-off*) vrijednost ukupnog tau je bila 345.9 pg/ml ($-AUC = 0.754$, $p < 0.004$) (**Slika 16**).



Slika 16. Analiza ROC krivulje za ukupni tau između VaD i KONT skupine ispitanika.

VaD, bolesnici sa vaskularnom demencijom; KONT, zdravi kontrolni ispitanici.

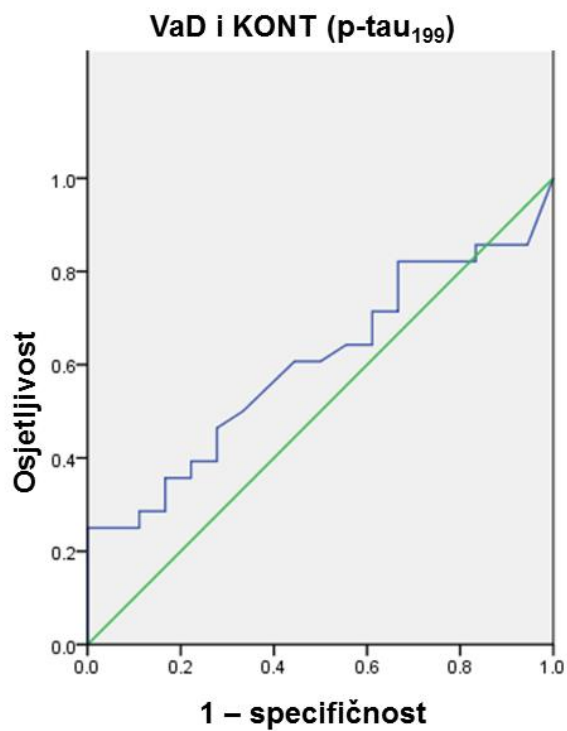
Biološki biljeg p-tau₁₈₁ je razlikovao oboljele od VaD od zdravih kontrola s 82.1% osjetljivosti i 61.1% specifičnosti. Izlučna vrijednost p-tau₁₈₁ je bila 36.4 pg/ml (AUC = 0.752, $p < 0.004$) (**Slika 17**).



Slika 17. Analiza ROC krivulje za p-tau₁₈₁ između VaD i KONT skupine ispitanika.

VaD, bolesnici s vaskularnom demencijom; KONT, zdravi kontrolni ispitanici.

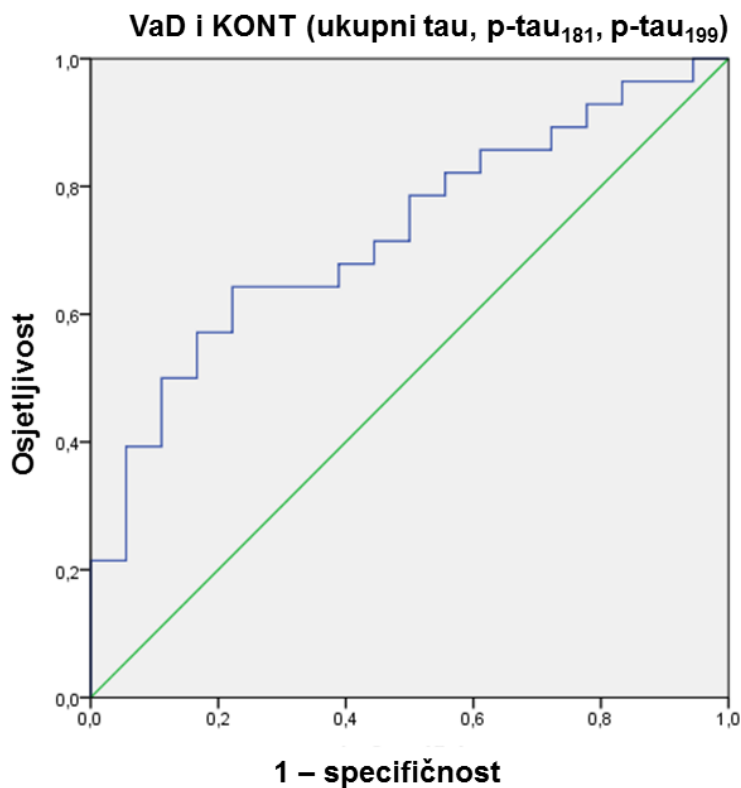
Biološki biljeg p-tau₁₉₉ je razlikovao bolesnike s VaD od KONT sa 46.4% osjetljivosti i 72.2% specifičnosti. Izlučna vrijednost p-tau₁₉₉ je bila 2.887 pg/ml (AUC = 0.601, $p = 0.251$) (**Slika 18**).



Slika 18. Analiza ROC krivulje za p-tau₁₉₉ između VaD i KONT skupine ispitanika.

VaD, bolesnici s vaskularnom demencijom; KONT, zdravi kontrolni ispitanici.

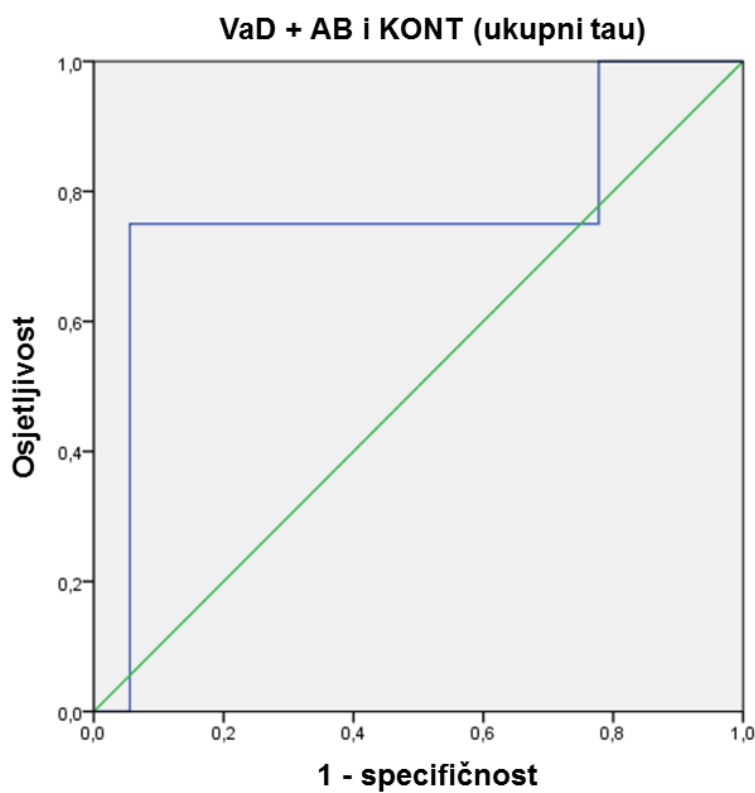
Faktorski skor proveden je i za skupinu bolesnika s VaD u usporedbi s kontrolnom skupinom ispitanika. Kada je određen faktorski skor, odnosno kada su sve tri varijable tau proteina spojene u jednu, dobiveni su sljedeći rezultati: faktorski skor (ukupni tau, p-tau181, p-tau199) je razlikovao oboljele od VaD od KONT skupine ispitanika sa 64.3% osjetljivosti i 77.8% specifičnosti. Izlučna vrijednost faktorskog skora (ukupni tau, p-tau181, p-tau199) je bila -0.6453601 (AUC = 0.726, $p < 0.010$) (Slika 19).



Slika 19. Analiza ROC krivulje za faktorski skor (ukupni tau, p-tau181 i p-tau199) između VaD i KONT skupine ispitanika.

VaD, bolesnici sa vaskularnom demencijom; KONT, zdravi kontrolni ispitanici.

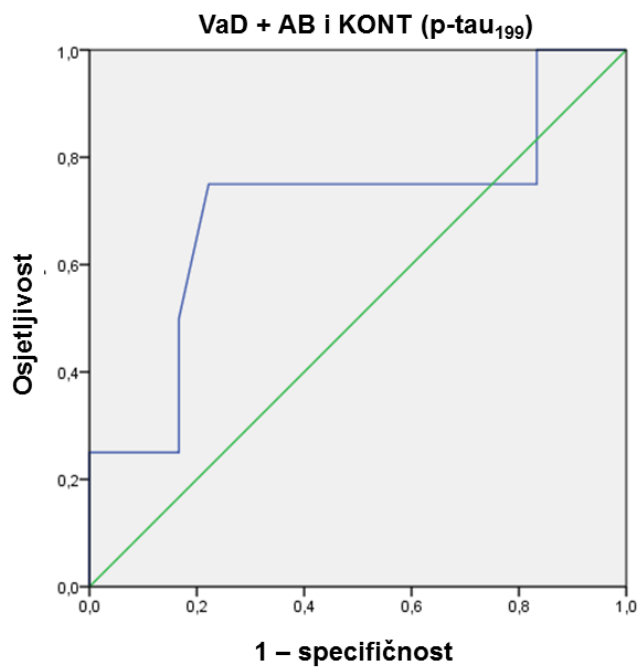
Analiza podataka za bolesnike iz skupine miješane demencije (VaD + AB) pokazala je da je ukupni tau razlikovao ispitanike iz te skupine od KONT skupine sa 75% osjetljivosti i 94.4% specifičnosti. Izlučna (*cut-off*) vrijednost ukupnog tau je bila 624.5 pg/ml (AUC = 0.764, $p < 0.106$) (**Slika 20**).



Slika 20. Analiza ROC krivulje za ukupni tau između VaD + AB i KONT skupine ispitanika.

VaD + AB, vaskularna demencija + Alzheimerova bolest (miješana demencija); KONT, zdravi kontrolni ispitanici.

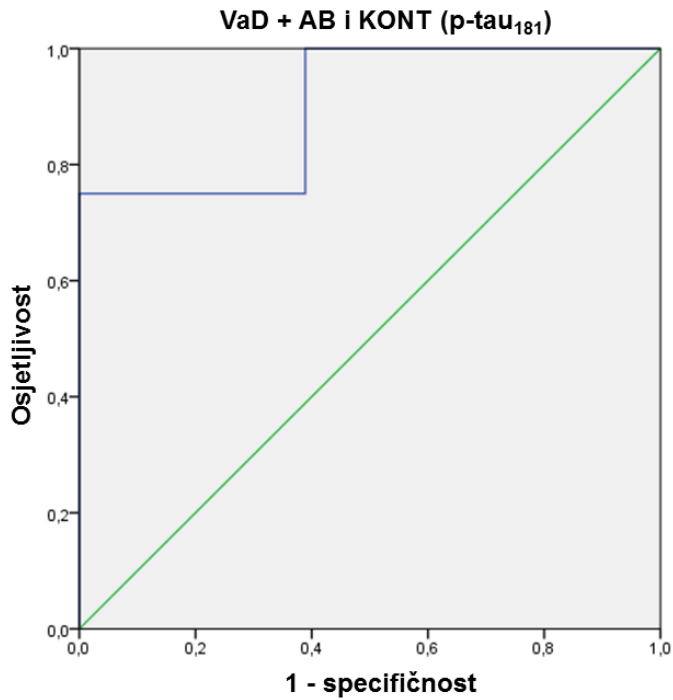
Biološki biljeg p-tau199 je razlikovao oboljele od VaD + AB od zdravih kontrola sa 75% osjetljivosti i 100% specifičnosti. Izlučna vrijednost p-tau199 je bila 87.2 pg/ml (AUC = 0.903, $p = 0.14$) (**Slika 21**).



Slika 21. Analiza ROC krivulje za p-tau199 između VaD + AB i KONT skupine ispitanika.

VaD + AB, vaskularna demencija + Alzheimerova bolest (miješana demencija); KONT, zdravi kontrolni ispitanici.

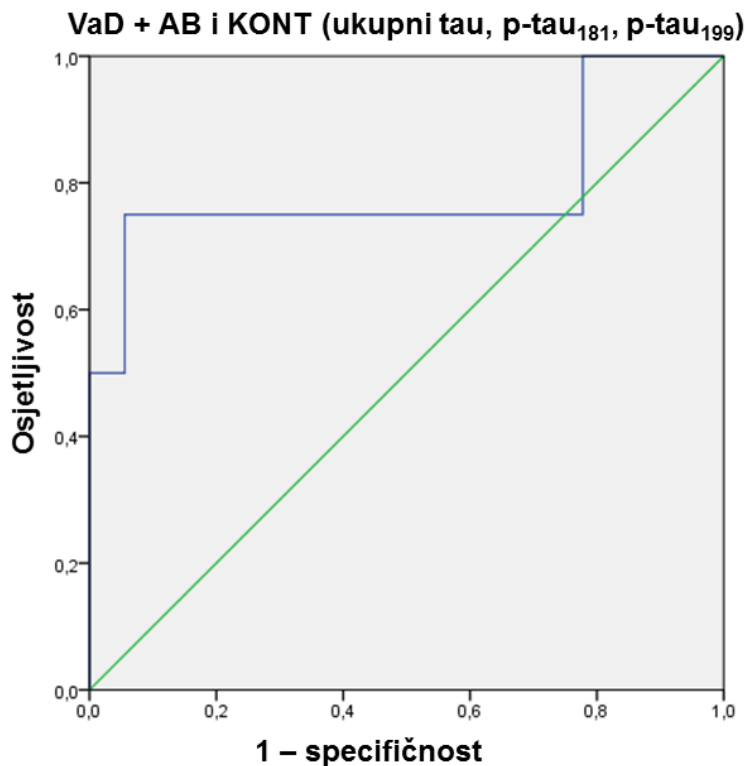
Biološki biljeg p-tau₁₈₁ je razlikovao oboljele od VaD + AB od zdravih kontrola sa 75% osjetljivosti i 77.8% specifičnosti. Izlučna vrijednost p-tau₁₈₁ je bila 3.375 pg/ml (AUC = 0.701, $p = 0.217$) (Slika 22).



Slika 22. Analiza ROC krivulje za p-tau₁₈₁ između VaD + AB i KONT skupine ispitanika.

VaD + AB, vaskularna demencija + Alzheimerova bolest (miješana demencija); KONT, zdravi kontrolni ispitanici.

Faktorski skor proveden je i za skupinu ispitanika s miješanom demencijom (VaD + AB) u usporedbi sa zdravim kontrolama. Kada je određen faktorski skor, odnosno kada su sve tri varijable tau proteina spojene u jednu, dobiveni su sljedeći rezultati: faktorski skor (ukupni tau, p-tau181, p-tau199) je razlikovao oboljele od VaD + AB od zdravih kontrola sa 75% osjetljivosti i 94.4% specifičnosti. Izlučna vrijednost faktorskog skora (ukupni tau, p-tau181, p-tau199) je bila 0.015311 (AUC = 0.792, $p < 0.074$) (**Slika 23**).



Slika 23. Analiza ROC krivulje za faktorski skor (ukupni tau, p-tau181 i p-tau199) između VaD + AB i KONT skupinu ispitanika.

VaD + AB, vaskularna demencija + Alzheimerova bolest (miješana demencija); KONT, zdravi kontrolni ispitanici.

Svi rezultati analiza ROC krivulja koji su ranije prikazani u ovom potpoglavlju su usporedno prikazani i u **Tablici 11**.

Tablica 11. Osjetljivost, specifičnost i izlučna vrijednost za ukupni tau, p-tau181, p-tau199 i FS (ukupni tau, p-tau181, p-tau199)

	AB vs KONT				VaD vs KONT				AB+VaD vs KONT			
	Ukupni tau	p-tau181	p-tau199	FS	Ukupni tau	p-tau181	p-tau199	FS	Ukupni tau	p-tau181	p-tau199	FS
Osjetljivost (%)	67.1	81.6	58.6	77	67.9	82.1	46.4	64.3	75	75	75	75
Specifičnost (%)	77.8	72.2	77.8	77.8	77.8	61.1	72.2	77.8	94.4	100	77.8	94.4
Izlučna vrijednost (pg/ml)	302.5	46.8	3.063	-0.6770133	345.9	36.4	2.887	-0.6453601	624.5	87.2	3.375	0.015311

FS, faktorski skor; AB, bolesnici s Alzheimerovom bolesti; VaD, bolesnici s vaskularnom demencijom; KONT, zdravi kontrolni ispitanici.

6.6. Biološki biljeg p-tau231

6.6.1. Usporedba vrijednosti p-tau231, FS (ukupni tau, p-tau181, p-tau199, p-tau231) i FS (MMSE i p-tau231) između bolesnika s AB, VaD, VaD + AB te zdravih kontrola

S obzirom na to da nismo u potpunosti bili zadovoljni rezultatima dobivenim određivanjem t-tau, p-tau181 i p-tau199 u razlikovanju AB i VaD, određivane su i razine biološkog biljega p-tau231 korištenjem ELISA testova. Učinjeno testiranje normalnosti raspodjele p-tau231, FS (ukupni tau, p-tau181, p-tau199, p-tau231) i FS (MMSE, p-tau231) unutar ispitivanih skupina je prikazano u **Tablici 12**. Također je napravljen faktorski skor kombinacijom svih ispitivanih bioloških biljega (ukupni tau, p-tau181, p-tau199, p-tau231) i kombinacijom broja MMSE bodova i p-tau231. Vrijednosti p-tau231 i FS (ukupni tau, p-tau181, p-tau199, p-tau231) su prikazane u **Tablicama 13 i 14** te **Slikama 24-26**.

Tablica 12. Testiranje normalnosti p-tau231 i FS (ukupni tau, p-tau181, p-tau199, p-tau231).

AB, bolesnici s Alzheimerovom bolesti; KONT, zdravi kontrolni ispitanici; VaD, bolesnici s vaskularnom demencijom; VaD + AB, vaskularna demencija + Alzheimerova bolest (miješana demencija).

Skupina (broj ispitanika u skupini)	Kolmogorov – Smirnovljev test normalnosti p-tau231	Faktorski skor (ukupni tau, p- tau181, p-tau199, p- tau231)	Faktorski skor (MMSE, p-tau231)
AB (146)	$p < 0.001$	$p = 0.008$	$p = 0.029$
KONT (18)	$p = 0.043$	$p = 0.492$	$p = 0.318$
VaD (20)	$p = 0.594$	$p = 0.391$	$p = 0.402$
VaD + AB (3)	$p = 0.999$	$p = 0.880$	$p = 0.999$

Tablica 13. Usporedba p-tau231 i faktorskog skora (ukupni tau, p-tau181, p-tau199, p-tau231) između AB, VaD, AB + VaD i KONT skupina ispitanika.

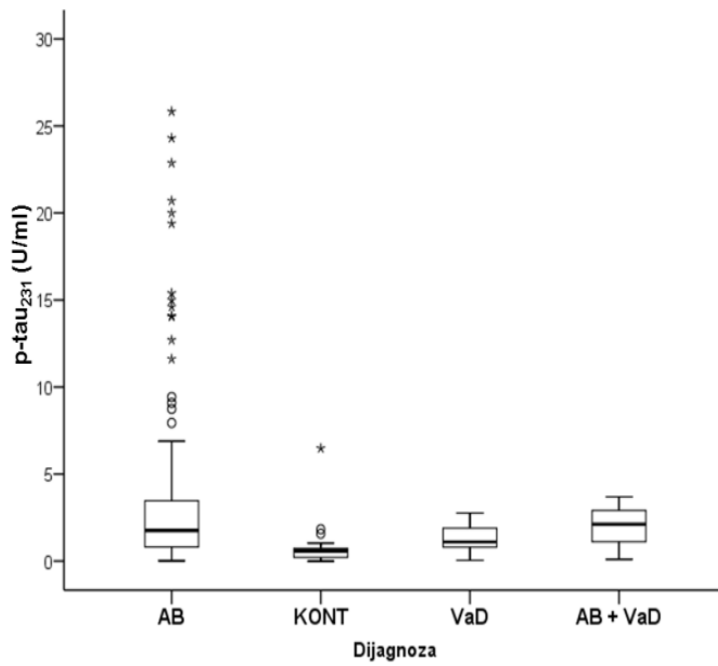
Group (broj ispitanika u skupini)	p-tau231 (U/ml)		Faktorski skor (ukupni tau, p-tau181, p-tau199, p-tau231)	
	Srednja vrijednost ± SD	Medijan (25-75. percentila)	Srednja vrijednost ± SD	Medijan (25-75. percentila)
AB (146)	3.501 ± 5.007	1.758 (0.805 – 3.493)	0.1148 ± 1.0338	-0.2035 (-0.6490 – 0.5991)
KONT (18)	0.907 ± 1.481	0.587 (0.164 – 0.803)	-0.7473 ± 0.4486	-0.7469 (-1.0306 – -0.6143)
VaD (20)	1.324 ± 0.704	1.098 (0.763– 1.905)	-0.1495 ± 0.8511	-0.3864 (-0.6993– 0.1924)
VaD + AD (3)	1.972 ± 1.798	2.122	-0.1054 ± 0.8292	0.2654

AB, bolesnici s Alzheimerovom bolesti; KONT, zdravi kontrolni ispitanici; VaD, bolesnici s vaskularnom demencijom; VaD + AB, vaskularna demencija + Alzheimerova bolest (miješana demencija).

Tablica 14. Usporedba faktorskog skora (MMSE, p-tau231) između AB, VaD, VaD + AB i KONT skupine ispitanika.

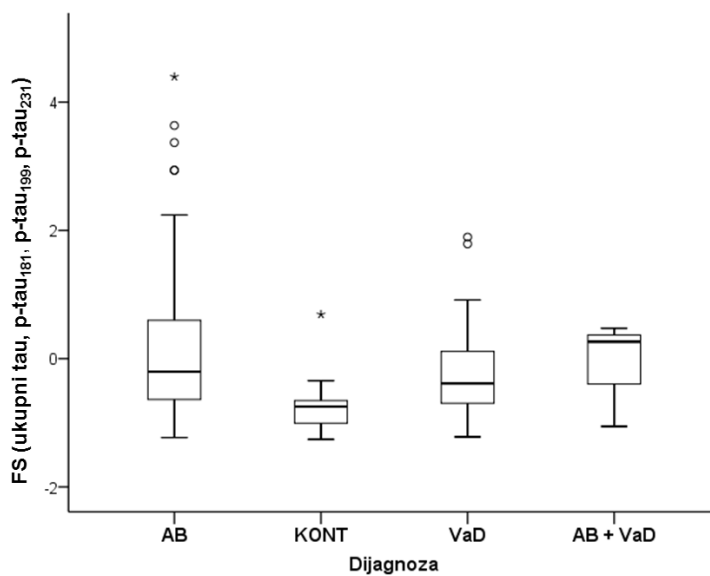
Skupina (broj ispitanika u skupini)	Faktorski skor (MMSE, p-tau231)	
	Srednja vrijednost ± SD	Medijan (25-75. percentila)
AB (144)	-0.1951 ± 0.9771	0.0487 (-0.5589 – 0.4655)
KONT (15)	1.2512 ± 0.3182	1.4310 (1.0136 – 1.5159)
VaD (20)	0.4847 ± 0.6916	0.7719 (-0.0378– 0.9689)
VaD + AB (3)	-0.1242 ± 0.3648	-0.1689

AB, bolesnici s Alzheimerovom bolesti; KONT, zdravi kontrolni ispitanici; VaD, bolesnici s vaskularnom demencijom; VaD + AB, vaskularna demencija + Alzheimerova bolest (miješana demencija).



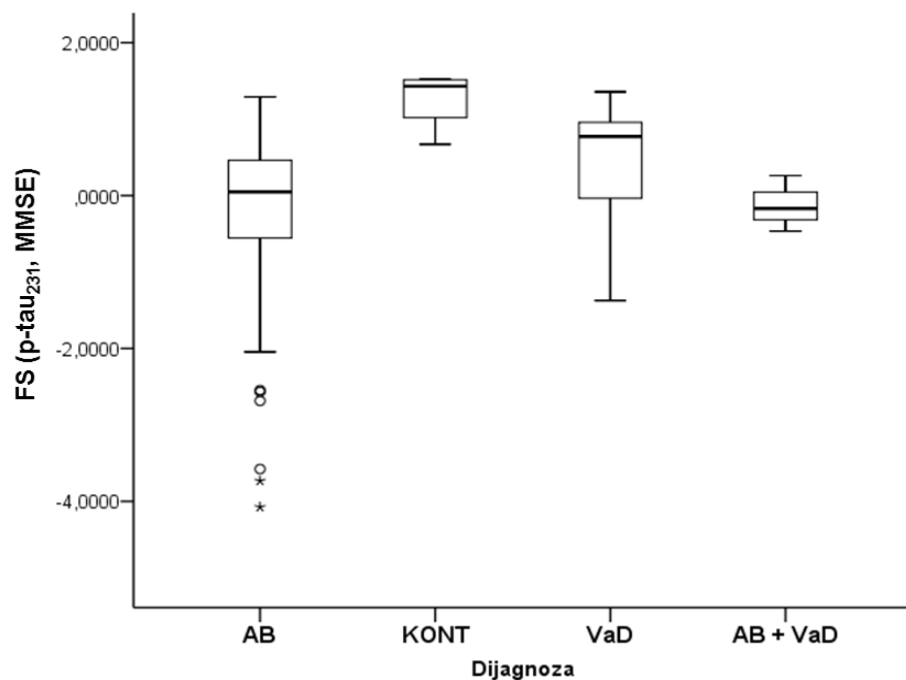
Slika 24. Usporedba srednjih vrijednosti p-tau231 između ispitivanih skupina.

AB, bolesnici s Alzheimerovom bolesti; KONT, zdravi kontrolni ispitanici; VaD, bolesnici s vaskularnom demencijom; VaD + AB, vaskularna demencija + Alzheimerova bolest (miješana demencija).



Slika 25. Faktorski skor(ukupni-tau, p-tau181, p-tau199, p-tau231).

AB, bolesnici s Alzheimerovom bolesti; KONT, zdravi kontrolni ispitanici; VaD, bolesnici s vaskularnom demencijom; VaD + AB, vaskularna demencija + Alzheimerova bolest (miješana demencija).



Slika 26. Faktorski skor za p-tau231 i MMSE.

AB, bolesnici s Alzheimerovom bolesti; KONT, zdravi kontrolni ispitanici; VaD, ispitanici s vaskularnom demencijom; VaD+AB, vaskularna demencija + Alzheimerova bolest (miješana demencija).

Vrijednosti p-tau231 su se značajno razlikovale između četiri ispitivne skupine (AB, VaD, VaD + AB i KONT) ($F = 2.891$; st. sl. = 3, 183; $p = 0.037$), ($\chi^2 = 18.592$; st. sl. = 3, $p < 0.001^*$). Vrijednosti p-tau231 između ispitivanih skupina su prikazane u **Tablici 15**.

Tablica 15. Usporedba vrijednosti p-tau231 između sve četiri ispitivane skupine (AB, VaD, VaD + AB i KONT) .

p-tau231	T-test	Mann-Whitney test
AB vs KONT	($t = 2.181$, st. sl. = 162, $p = 0.031$)*	($U = 548$, $Z = -4.030$, $p < 0.001$) *
AB vs VaD	($t = 1.937$, st. sl. = 164, $p = 0.054$)	($U = 1123$, $Z = -1.672$, $p = 0.095$)
AB vs VaD +AB	($t = 0.527$, st. sl. = 147, $p = 0.599$)	($U = 195.5$, $Z = -0.318$, $p = 0.751$)
VaD vs KONT	($t = -1.126$, st. sl. = 36, $p = 0.268$)	($U = 79.5$, $Z = -2.940$, $p = 0.003$) *
VaD vs VaD + AB	($t = -1.125$, st. sl. = 19, $p = 0.275$)	($U = 16$, $Z = -1.109$, $p = 0.307$)
VaD + AB vs KONT	($t = -1.204$, st. sl. = 21, $p = 0.242$)	($U = 22$, $Z = -0.730$, $p = 0.465$)

AB, bolesnici s Alzheimerovom bolesti; KONT, zdravi kontrolni ispitanici; VaD, bolesnici s vaskularnom demencijom; VaD + AB, vaskularna demencija + Alzheimerova bolest (miješana demencija).

Plavo su označene vrijednosti za koje je statistička značajnost izgubljena nakon Bonferronijeve korekcije.

Vrijednosti faktorskog skora (ukupni tau, p-tau181, p-tau199, p-tau231) su se značajno razlikovale između četiri ispitivane skupine (AB, VaD, VaD + AB i KONT): $F = 4.379$; st. sl. = 3, 183; $p = 0.005^*$, $\chi^2 = 18.357$; st. sl. = 3, $p < 0.001^*$. Vrijednosti p-tau231 između ispitivanih skupina su prikazane u **Tablici 16**.

Tablica 16. Usporedba vrijednosti faktorskog skora (ukupni tau, p-tau181, p-tau199, p-tau231) između četiriju ispitivanih skupina (AB, VaD, VaD + AB i KONT).

Ukupni tau, p-tau181, p-tau199 i p-tau231	T-test	Mann-Whitney test
AB vs KONT	($t = 3.490$, st. sl. = 162, $p = 0.001^*$)	($U = 516$, $Z = -4.198$, $p < 0.001^*$)
AB vs VaD	($t = 1.093$, st. sl. = 164, $p = 0.276$)	($U = 1239$, $Z = -1.096$, $p = 0.273$)
AB vs VaD + AB	($t = 0.366$, st. sl. = 147, $p = 0.715$)	($U = 208$, $Z = -0.149$, $p = 0.882$)
VaD vs KONT	($t = -2.663$, st. sl. = 36, $p = 0.011^*$)	($U = 82$, $Z = -2.865$, $p = 0.004^*$)
VaD vs VaD + AB	($t = -2.049$, st. sl. = 19, $p = 0.055$)	($U = 16$, $Z = -1.106$, $p = 0.269$)
VaD + AB vs KONT	($t = -0.084$, st. sl. = 21, $p = 0.934$)	($U = 26$, $Z = -0.365$, $p = 0.715$)

AB, bolesnici s Alzheimerovom bolesti; KONT, zdravi kontrolni ispitanici; VaD, bolesnici s vaskularnom demencijom; VaD + AB, vaskularna demencija + Alzheimerova bolest (miješana demencija).

Plavo su označene vrijednosti za koje je statistička značajnost izgubljena nakon Bonferronijeve korekcije.

Vrijednosti faktorskog skora (p-tau231 i MMSE) su se značajno razlikovale između četiri ispitivne skupine (AB, VaD, VaD + AB i KONT) ($F = 13.579$; st. sl. = 3, 178; $p < 0.001^*$, $\chi^2 = 45.019$; st. sl. = 3, $p < 0.001^*$). Vrijednosti p-tau231 između ispitivanih skupina su prikazane u **Tablici 17**.

Tablica 17. Usporedba vrijednosti faktorskog skora (p-tau231 i MMSE) između ispitivanih skupina (AB, VaD, VaD + AB i KONT).

MMSE + p-tau231	T-test	Mann-Whitney test
AB vs KONT	(t = -5.687, st. sl. = 157, p < 0.001)*	(U = 71, Z = -5.946, p < 0.001)*
AB vs VaD	(t = -3.005, st. sl. = 162, p = 0.003)*	(U = 760, Z = -3.417, p = 0.001)*
AB vs VaD + AB	(t = -0.125, st. sl. = 145, p = 0.901)	(U = 194, Z = -0.301, p = 0.763)
VaD vs KONT	(t = 3.977, st. sl. = 33, p < 0.001)*	(U = 39, Z = -3.700, p < 0.001)*
VaD vs VaD + AB	(t = 6.705, st. sl. = 16, p < 0.001)*	(U = 0.001, Z = -2.666, p = 0.002)*
VaD + AB vs KONT	(t = 1.474, st. sl. = 21, p = 0.155)	(U = 11, Z = -1.734, p = 0.094)

AB, bolesnici s Alzheimerovom bolešću; KONT, zdravi kontrolni ispitanici; VaD, bolesnici s vaskularnom demencijom; VaD + AB, vaskularna demencija + Alzheimerova bolest (miješana demencija).

Plavo su označene vrijednosti za koje je statistička značajnost izgubljena nakon Bonferronijeve korekcije.

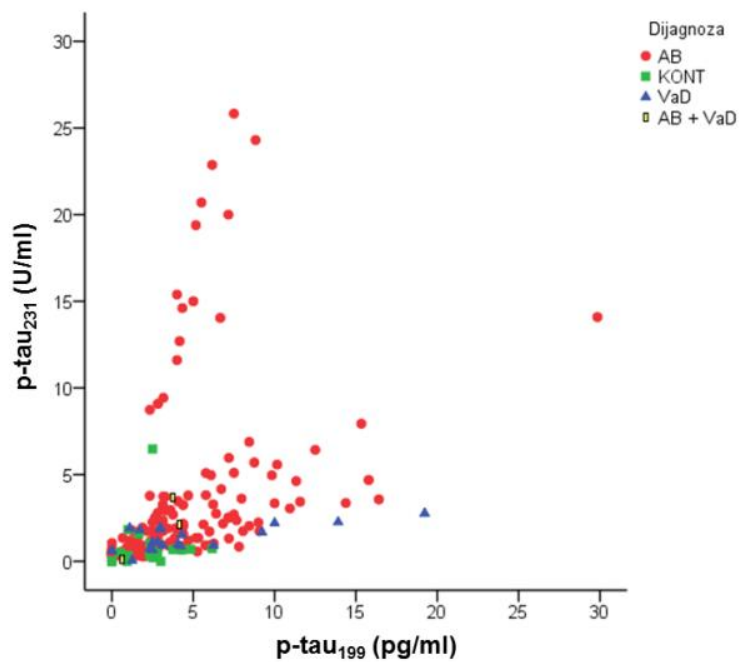
6.6.2. Korelacija p-tau231 s ukupnim tau, p-tau181 i p-tau199

U ovom potpoglavlju promatrana je korelacija između pojedinih bioloških biljega, odnosno zavisnost p-tau231 u odnosu na ukupni tau, zavisnost p-tau181 u odnosu na p-tau231 te međuodnos p-tau199 i p-tau231 (**Tablica 18, Slike 27-29**). Koristeći Pearsonov koeficijent korelacije (r), međusobni je odnos između dviju varijabli grafički prikazan uz pomoć dijagrama raspršenja, pri čemu su vrijednosti jedne varijable prikazane na apscisi, a druge na ordinati. Ukoliko nije postojao linearni oblik povezanosti među varijablama, korišten je Spearmanov koeficijent korelacije (r_s).

Tablica 18. Korelacija između pojedinih bioloških biljega.

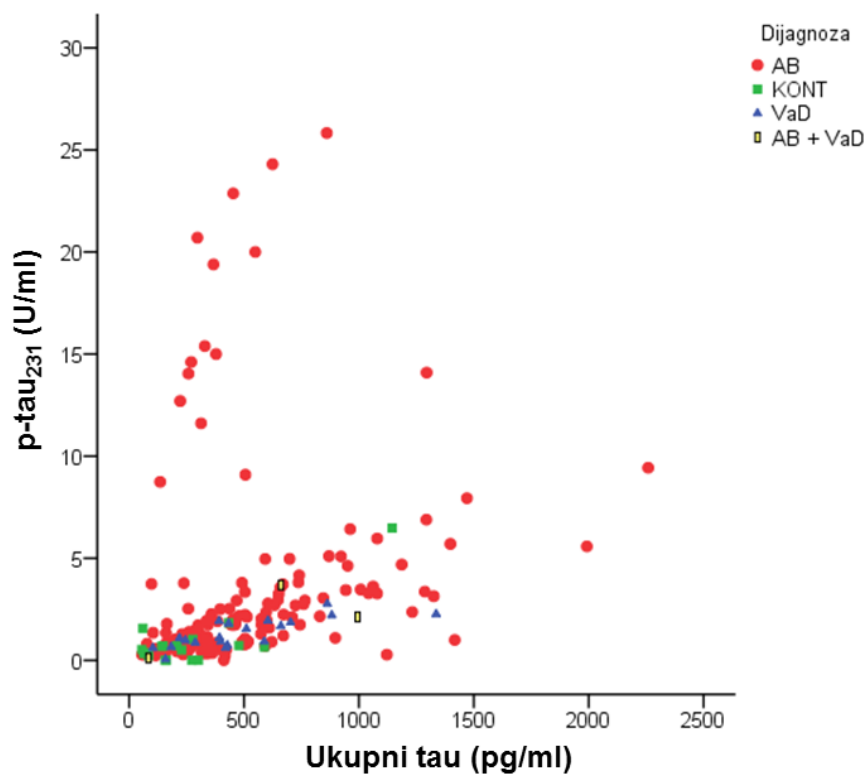
Korelacije bioloških biljega	Ukupni tau vs p-tau231		p-tau181 vs p-tau231		p-tau199 vs p-tau231	
	Pearsonova korelacija	Spearmanova korelacija	Pearsonova korelacija	Spearmanova korelacija	Pearsonova korelacija	Spearmanova korelacija
Svi ispitanici	($r = 0.251$, st. sl. = 185, $p = 0.001$)*	($r_s = 0.609$, st. sl. = 185, $p < 0.001$)*	($r = 0.710$, st. sl. = 185, $p < 0.001$)*	($r_s = 0.752$, st. sl. = 185, $p < 0.001$)*	($r = 0.367$, st. sl. = 185, $p < 0.001$)*	($r_s = 0.685$, st. sl. = 185, $p < 0.001$)*
AB (146)	($r = 0.211$, st. sl. = 144, $p = 0.011$)	($r_s = 0.543$, st. sl. = 144, $p < 0.001$)*	($r = 0.714$, st. sl. = 144, $p < 0.001$)*	($r_s = 0.735$, st. sl. = 144, $p < 0.001$)*	($r = 0.378$, st. sl. = 144, $p < 0.001$)*	($r_s = 0.706$, st. sl. = 144, $p < 0.001$)*
KONT (18)	($r = 0.815$, st. sl. = 16, $p < 0.001$)*	($r_s = 0.272$, st. sl. = 16, $p = 0.275$)	($r = 0.609$, st. sl. = 16, $p = 0.007$)	($r_s = 0.381$, st. sl. = 16, $p = 0.118$)	($r = 0.077$, st. sl. = 16, $p = 0.761$)	($r_s = 0.341$, st. sl. = 16, $p = 0.166$)
VaD (20)	($r = 0.781$, st. sl. = 18, $p < 0.001$)*	($r_s = 0.772$, st. sl. = 18, $p < 0.001$)*	($r = 0.790$, st. sl. = 18, $p < 0.001$)*	($r_s = 0.761$, st. sl. = 18, $p < 0.001$)*	($r = 0.699$, st. sl. = 18, $p = 0.001$)*	($r_s = 0.591$, st. sl. = 18, $p = 0.006$)
VaD + AB (3)	($r = 0.681$, st. sl. = 1, $p = 0.523$)	($r_s = 0.500$, st. sl. = 1, $p = 0.667$)	($r = 0.883$, st. sl. = 1, $p = 0.312$)	($r_s = 0.500$, st. sl. = 1, $p = 0.667$)	($r = 0.850$, st. sl. = 1, $p = 0.353$)	($r_s = 0.500$, st. sl. = 1, $p = 0.667$)

AB, bolesnici s Alzheimerovom bolesti; KONT, zdravi kontrolni ispitanici; VaD, bolesnici s vaskularnom demencijom; VaD + AB, vaskularna demencija + Alzheimerova bolest (miješana demencija).



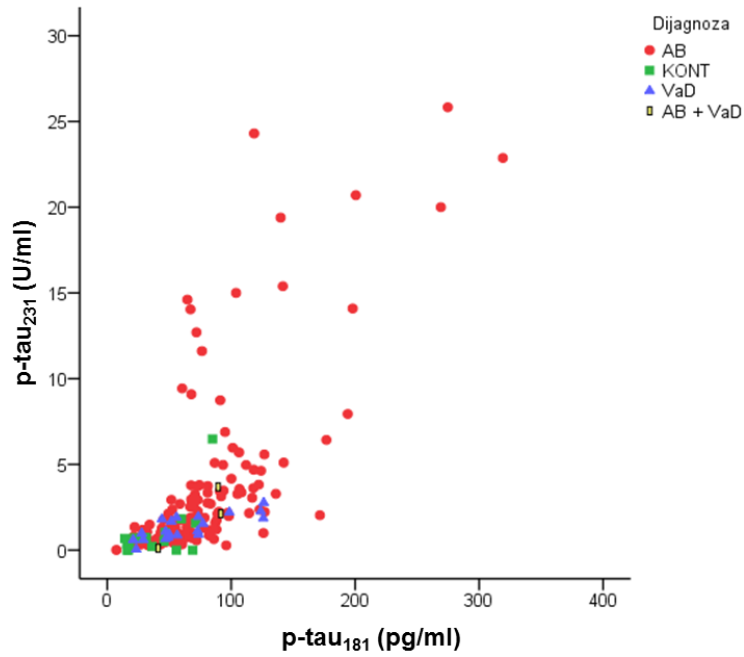
Slika 27. Korelacija izmjerenih vrijednosti p-tau199 u odnosu na p-tau231.

AB, bolesnici s Alzheimerovom bolesti; KONT, zdravi kontrolni ispitanici; VaD, bolesnici s vaskularnom demencijom; VaD + AB, vaskularna demencija + Alzheimerova bolest (miješana demencija).



Slika 28. Korelacija izmjerenih vrijednosti ukupnog tau u odnosu na p-tau231.

AB, bolesnici s Alzheimerovom bolešću; KONT, zdravi kontrolni ispitanici; VaD, bolesnici s vaskularnom demencijom; VaD + AB, vaskularna demencija + Alzheimerova bolest (miješana demencija).



Slika 29. Korelacija izmjerenih vrijednosti p-tau181 u odnosu na p-tau231.

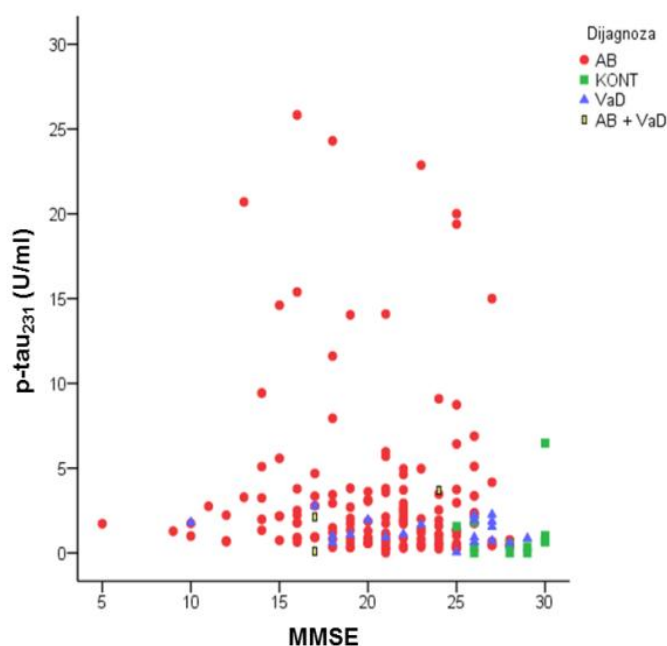
AB, bolesnici s Alzheimerovom bolesti; KONT, zdravi kontrolni ispitanici; VaD, bolesnici s vaskularnom demencijom; VaD + AB, vaskularna demencija + Alzheimerova bolest (miješana demencija).

Promatrana je i korelaciju između p-tau231 i broja bodova na MMSE ljestvici (**Tablica 19, Slika 30**). Također su korištene Pearsonov (r) i Spearmanov koeficijent korelacije (r_s).

Tablica 19. Korelacija izmjerenih razina p-tau231 s brojem bodova na MMSE ljestvici.

Korelacije MMSE i bioloških biljega	MMSE vs p-tau231	
	Pearsonova korelacija	Spearmanova korelacija
Svi ispitanici	($r=-0.128$, st. sl.=180, $p=0.086$)	($r_s=-0.237$, st. sl.=180, $p=0.001$)
AB (144)	($r=-0.062$, st. sl.=142, $p=0.461$)	($r=-0.139$, st. sl.=142, $p=0.097$)
KONT (15)	($r=0.146$, st. sl.=13, $p=0.604$)	($r_s=0.279$, st. sl.=13, $p=0.313$)
VaD (20)	($r=-0.196$, st. sl.=18, $p=0.407$)	($r_s=-0.184$, st. sl.=18, $p=0.438$)
VaD + AD (3)	($r=0.828$, st. sl.=1, $p=0.379$)	($r_s=0.866$, st. sl.=1, $p=0.333$)

AB, bolesnici s Alzheimerovom bolesti; KONT, zdravi kontrolni ispitanici; VaD, bolesnici s vaskularnom demencijom; VaD + AB, vaskularna demencija + Alzheimerova bolest (miješana demencija).



Slika 30. Odnos izmjerenih razina p-tau231 i broja bodova na MMSE ljestvici.

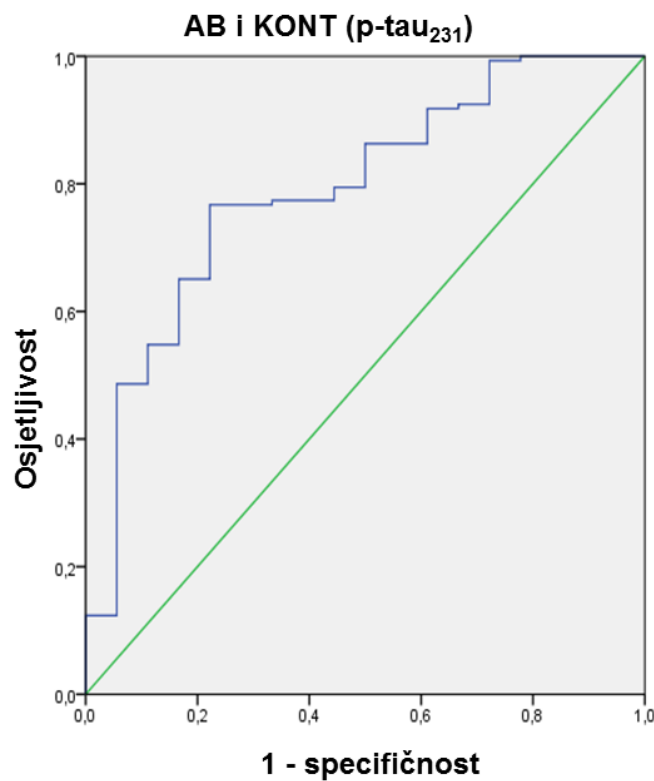
AB, bolesnici s Alzheimerovom bolesti; KONT, zdravi kontrolni ispitanici; VaD, bolesnici s vaskularnom demencijom; VaD + AB, vaskularna demencija + Alzheimerova bolest (miješana demencija).

6.6.3. Osjetljivost i specifičnost p-tau231, FS (ukupni tau, p-tau181, p-tau199, p-tau231) i FS (p-tau231 i MMSE)

U ovom se potpoglavlju analizira osjetljivost i specifičnost biomarkera p-tau231 i FS (ukupni-tau, p-tau181, p-tau199, p-tau231) pomoću ROC krivulje.

Biomarker p-tau2131 je razlikovao oboljele od AB od zdravih kontrola sa 76.7%

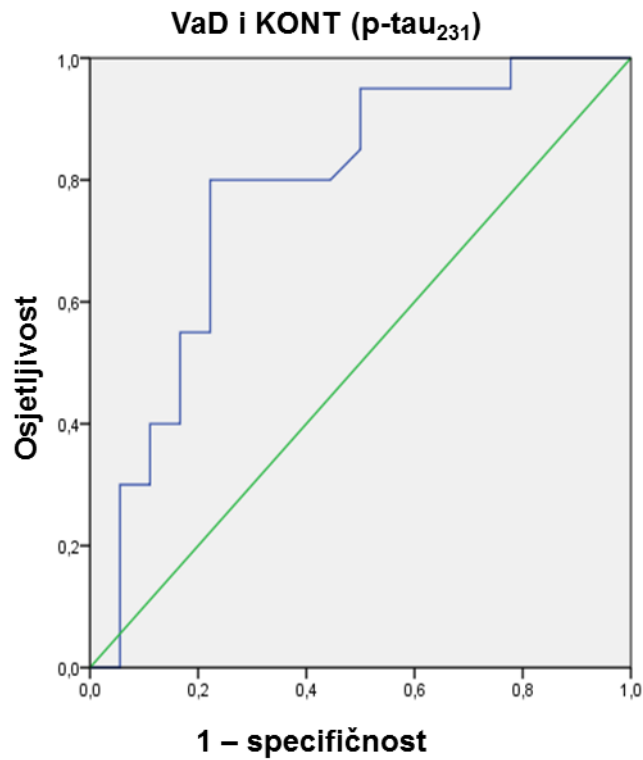
osjetljivosti i 77.8% specifičnosti. Izlučna vrijednost p-tau231 je bila 0.734 U/ml (– AUC = 0.791, $p < 0.000$, **Slika 31**).



Slika 31. Analiza ROC krivulje za p-tau231 između AB i KONT skupinu ispitanika.

AB, bolesnici s Alzheimerovom bolesti; KONT, zdravi kontrolni ispitanici.

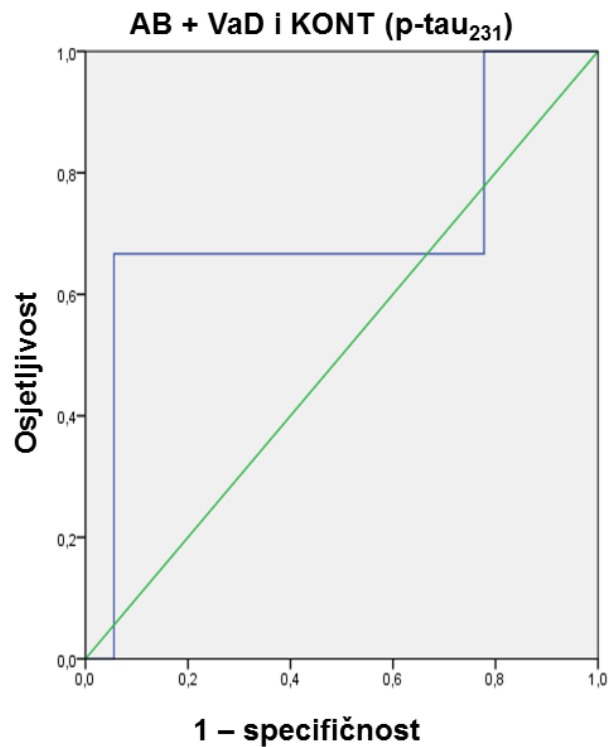
Biološki biljeg p-tau₂₁₃₁ je razlikovao oboljele od VaD od KONT skupine ispitanika s 80% osjetljivosti i 77.8% specifičnosti. Izlučna vrijednost p-tau₂₃₁ je bila 0.728 U/ml ($-AUC = 0.779$, $p < 0.003$, **Slika 32**).



Slika 32. Analiza ROC krivulje za p-tau₂₃₁ između VaD i KONT skupine ispitanika.

VaD, bolesnici sa vaskularnom demencijom; KONT, zdravi kontrolni ispitanici.

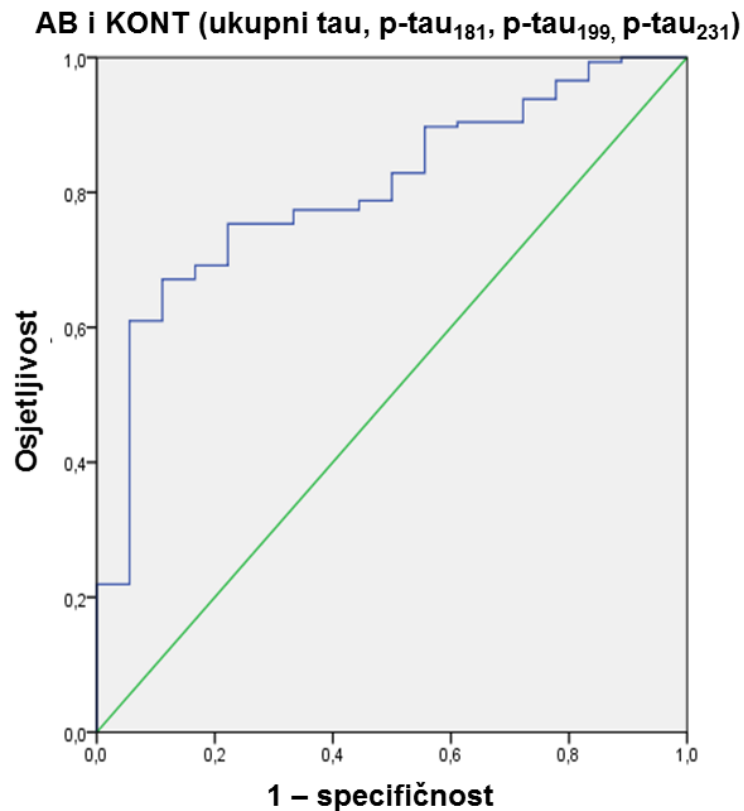
Biološki biljeg p-tau₂₃₁ je razlikovao oboljele od VaD + AB od KONT skupine ispitanika sa 66.7% osjetljivosti i 94.4% specifičnosti. Izlučna vrijednost p-tau₂₃₁ je bila 1.976 U/ml ($-AUC = 0.704$, $p < 0.269$, **Slika 33**).



Slika 33. Analiza ROC krivulje za p-tau₂₃₁ između VaD+AB i KONT skupine ispitanika.

VaD+AB, vaskularna demencija + Alzheimerova bolest (**miješana demencija**); KONT, zdravi kontrolni ispitanici.

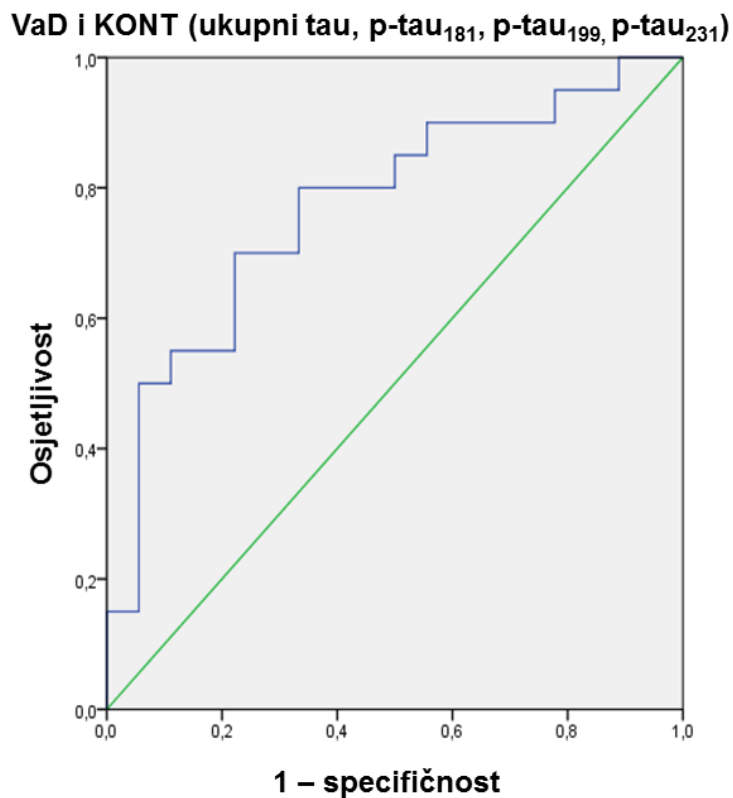
FS (ukupni tau, p-tau181, p-tau199, p-tau231) je razlikovao bolesnike s AB od KONT skupine sa 67.1% osjetljivosti i 88.9% specifičnosti. Izlučna vrijednost FS (ukupni tau, p-tau181, p-tau199, p-tau231) je bila -0.4580 U/ml (AUC = 0.804, $p < 0.000$, **Slika 34**).



Slika 34. Analiza ROC krivulje za FS (ukupni tau, p-tau181, p-tau199, p-tau231) između bolesnika s AB i KONT skupinu ispitanika.

AB, bolesnici s Alzheimerovom bolesti; KONT, zdravi kontrolni ispitanici.

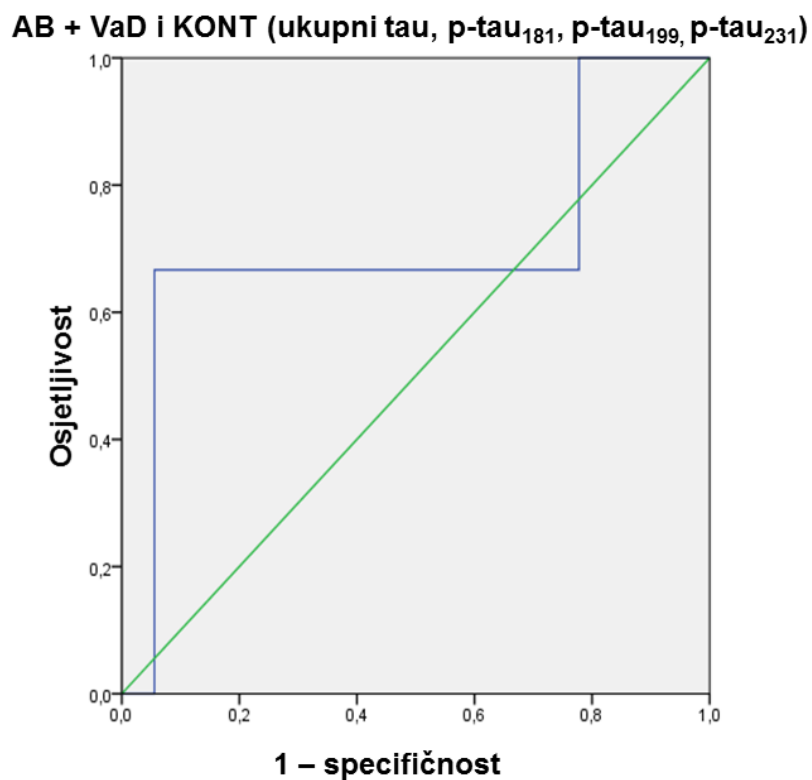
FS (ukupni tau, p-tau₁₈₁, p-tau₁₉₉, p-tau₂₃₁) je razlikovao bolesnike s VaD od KONT skupine sa 70% osjetljivosti i 77.8% specifičnosti. Izlučna vrijednost FS (ukupni tau, p-tau₁₈₁, p-tau₁₉₉, p-tau₂₃₁) je bila -0.6078 U/ml (AUC= 0.772, $p < 0.004$, **Slika 35**).



Slika 35. Analiza ROC krivulje za FS (ukupni tau, p-tau₁₈₁, p-tau₁₉₉, p-tau₂₃₁) između bolesnika s VaD i KONT skupine ispitanika.

VaD, bolesnici s vaskularnom demencijom; KONT, zdravi kontrolni ispitanici.

FS (ukupni tau, p-tau₁₈₁, p-tau₁₉₉, p-tau₂₃₁) je razlikovao skupinu bolesnika s miješanom demencijom (VaD+AB) od KONT skupine sa 66.7% osjetljivosti i 94.4% specifičnosti. Izlučna vrijednost FS (ukupni tau, p-tau₁₈₁, p-tau₁₉₉, p-tau₂₃₁) je bila -0.0393 U/ml (AUC= 0.704, $p < 0.269$, **Slika 36**).

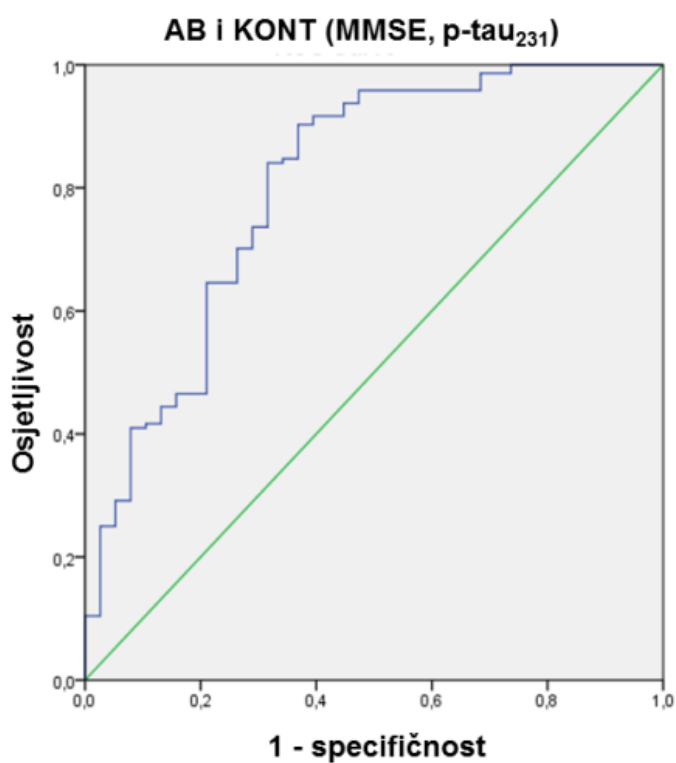


Slika 36. Analiza ROC krivulje za FS (ukupni tau, p-tau₁₈₁, p-tau₁₉₉, p-tau₂₃₁) između VaD + AB i KONT skupine ispitanika.

VaD + AB, vaskularna demencija + Alzheimerova bolest (miješana demencija); KONT, zdravi kontrolni ispitanici.

6.6.4. Analiza FS za p-tau231 i MMSE

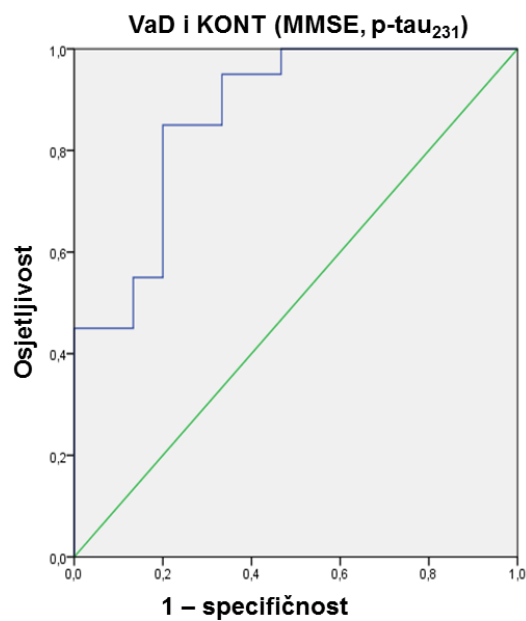
FS (p-tau231 i MMSE) je razlikovao bolesnike s AB od KONT skupine s 90.3% osjetljivosti i 63.2% specifičnosti. Izlučna vrijednost FS (p-tau231 i MMSE) je bila 0.7479 U/ml ($-AUC = 0.805$, $p < 0.000$, **Slika 37**).



Slika 37. Analiza ROC krivulje za FS (p-tau₂₃₁ i MMSE) između AB i KONT skupine ispitanika.

AB, bolesnici s Alzheimerovom bolešću; KONT, zdravi kontrolni ispitanici.

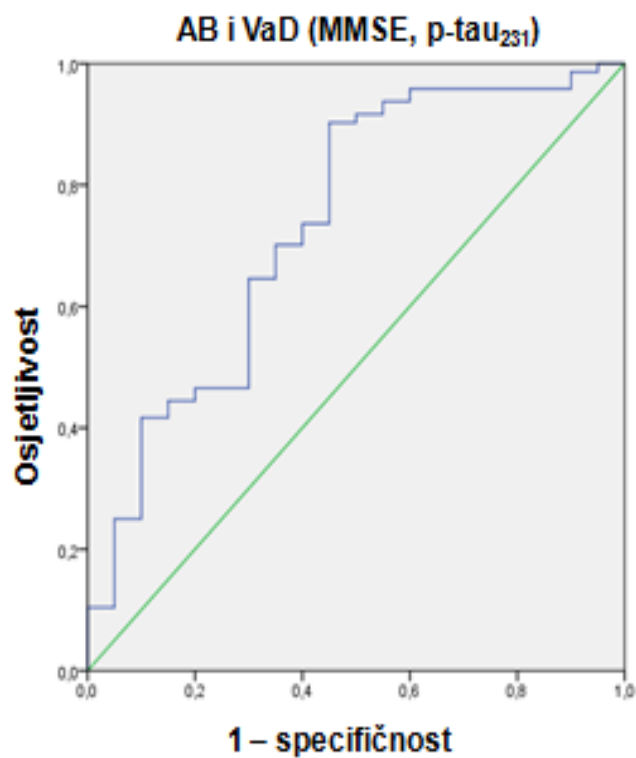
FS (p-tau 231 i MMSE) je razlikovao bolesnike s VaD od KONT skupine s 80% osjetljivosti i 85% specifičnosti. Izlučna vrijednost FS (p-tau231 i MMSE) je bila 0.9993 U/ml ($-AUC = 0.870$, $p < 0.000$, **Slika 38**).



Slika 38. Analiza ROC krivulje za FS (p-tau231 i MMSE) između VaD i KONT skupine ispitanika.

VaD, bolesnici s vaskularnom demencijom; KONT, zdravi kontrolni ispitanici.

FS (p-tau₂₃₁ i MMSE) je razlikovao bolesnike s miješanom demencijom (VaD + AB) s 90.3% osjetljivosti i 55% specifičnosti. Izlučna vrijednost FS (p-tau₂₃₁ i MMSE) je bila 0.7479 U/ml ($-AUC = 0.736$, $p < 0.001$, **Slika 39**).



Slika 39. Analiza ROC krivulje za FS (p-tau₂₃₁ i MMSE) između VaD + AB i KONT skupine ispitanika.

VaD + AB, vaskularna demencija + Alzheimerova bolest (miješana demencija); KONT, zdravi kontrolni ispitanici.

Tablica 20. Osjetljivost, specifičnost i izlučna vrijednost za p-tau231, FS (p-tau231, ukupni tau, p-tau181, p-tau199) i FS (p-tau231, MMSE) u ispitivanim skupinama.

	AB vs KONT			VaD vs KONT			VaD + AB vs KONT		
	p-tau 231	FS (p-tau231, ukupni tau, p-tau 181, p-tau199)	FS (p-tau 231, MMSE)	p-tau231	FS (p-tau231, ukupni tau, p-tau 181, p-tau199)	FS (p-tau231, MMSE)	p-tau231	FS (p-tau231, ukupni tau, p-tau 181, p-tau199)	FS (p-tau231, MMSE)
Osjetljivost (%)	76.7	67.1	90.3	80	70	80	66.7	66.7	90
Specifičnost (%)	77.8	88.9	63.2	77.8	77.8	85	94.4	94.4	55
Izlučna vrijednost (pg/ml)	0.734	-0.4580	0.7479	0.728	-0.6078	0.870	1.976	-0.0393	0.7479

AB, bolesnici s Alzheimerovom bolesti; KONT, zdravi kontrolni ispitanici; VaD, bolesnici s vaskularnom demencijom; VaD + AB, vaskularna demencija + Alzheimerova bolest (miješana demencija), FS, faktorski skor, MMSE, *Mini-Mental State Examination*, mala ljestvica mentalnog stanja.

7. RASPRAVA

U ovom smo istraživanju analizirali dijagnostičku vrijednost specifičnih bioloških biljega: ukupni tau protein, p-tau181, p-tau199, p-tau231 te FS (za ukupni tau, p-tau181 i p-tau199), FS (za ukupni tau, p-tau181, p-tau199 i p-tau231) i FS (p-tau231 i MMSE) u svrhu dijagnostičkog razlikovanja bolesnika s AB u odnosu na bolesnike s VaD, bolesnika s AB i VaD u odnosu na zdrave kontrolne ispitanike, kao i u bolesnika s miješanom demencijom (VaD+AB) u odnosu na zdrave kontrolne ispitanike. Do sada objavljena istraživanja određivala su i analizirala dijagnostičku vrijednost ukupnog tau proteina u odnosu na pojedine fosforilirane tau proteine kao biološke biljege u usporedbi bolesnika s AB ili VaD u odnosu na zdrave kontrolne ispitanike, dok se samo u manjem broju radova istraživala dijagnostička vrijednost drugih potencijalno korisnih bioloških biljega u razlikovanju AB i VaD²³³⁻²⁴⁹. FS nije do sada izračunavan niti je jednom od navedenih istraživanja, a vrlo slabo je proučavana i dijagnostička vrijednost bioloških biljega u dijagnostici miješane demencije, tj. ispitanika koji su ispunjavali kriterije i za AB i za VaD.

Kao što je prikazano u rezultatima, u svim ispitivanim skupinama bio je podjednak broj muškaraca i žena, srednja životna dob bolesnika s AB, VaD i VaD+AB bila je 71-74 godine, dok su zdravi kontrolni ispitanici bili nešto mlađi, srednje životne dobi oko 59 godina. Ipak, nakon Bonferonijeve korekcije za višestruke usporedbe se navedena razlika u godinama između skupina nije pokazala statistički značajnom. Prema MMSE ljestvici, većina bolesnika s AB je imala blagi do umjereni stupanj demencije, što je odgovaralo broju MMSE bodova od 19 do 22.

Najviše ispitivani biološki biljeg za ranu dijagnostiku sindroma demencije u ranije objavljenim radovima je bio ukupni tau protein. Prosječno povećanje ukupnog tau proteina u likvoru bolesnika s AB bilo je 200-300% od normalnih vrijednosti²⁵⁸. Vandermeeren i suradnici objavili su još 1993. godine da je ukupni tau u likvoru povišen u bolesnika s AB u odnosu na zdrave kontrolne ispitanike, što su potvrdila i kasnija ispitivanja.^{259,260} Ta su istraživanja pokazala da bi ukupni tau protein najviše odgovarao kao biljeg sveukupnog oštećenja živčanih stanica²³³, pa je stoga povišen ne samo u AB, već i u drugim primarnim uzrocima demencije. Prvi radovi u ovom području koristili su ELISA testove s poliklonskim protutijelima²⁶¹, no kasnije su

uvodeni usavršeni komercijalni ELISA testovi s monoklonskim antitijelima kojima se mogu određivati razine svih izooblika tau proteina, neovisno o stanju njihove fosforiliranosti²⁶²⁻²⁶⁴ Osim toga, noviji radovi pokazali su i da razina ukupnog tau u likvoru odražava sveukupni intenzitet oštećenja neurona pa zbog toga ima smisla pratiti njegove povišene razine u bolesnika s vaskularnim oštećenjima²⁶⁵, dok su najviše vrijednosti ukupnog tau proteina opisane u CJB gdje je prisutno vrlo intenzivno odumiranje neurona.²⁶⁶ Prolazno povećanje ukupnog tau proteina u akutnom moždanom udaru pokazuje i dobru korelaciju s veličnom infarkta mozga mjereno kompjutoriziranom tomografijom mozga.²⁶⁵

U našem istraživanju ukupni tau protein očekivano se pokazao se statistički značajno povišen u ispitanika s AB u odnosu na zdrave kontrolne ispitanike, kao i u ispitanika s VaD + AB i VaD u odnosu na zdrave kontrolne ispitanike. Sama vrijednost ukupnog tau proteina u pg/ml prikazana kao medijan (25. do 75. percentila) ima najviše vrijednosti u skupini VaD + AB, ali povećanje nije bilo statistički značajno ni u skupini VaD + AB bolesnika u usporedbi sa skupinom bolesnika s AB niti u skupini bolesnika s AB naspram bolesnika s VaD. Schönknecht i suradnici²⁶⁷ su 2003. godine pokazali kako je razina ukupnog tau proteina bila statistički značajno viša u bolesnika s AB u odnosu na bolesnike s VaD, te u odnosu na zdrave kontrolne ispitanike, kao i napram bolesnika s velikim depresivnim poremećajem. Slični rezultati objavljeni su u i brojnim ranijim radovima, npr. Arai i sur, 1995; Blennow i sur, 1995; Jensen i sur, 1995; Mori i sur, 1995; Motter i sur, 1995; Skoof i sur 1995 i u drugim radovima.²⁶⁷ Ipak, u manjem broju objavljenih publikacija, npr. Skooga i suradnika, 1995; Andreasena i suradnika, 1998, te Tapiole i sur, 1998, nije potvrđeno da su vrijednosti ukupnog tau proteina bile značajno više u bolesnika s AB u usporedbi sa skupinom bolesnika s VaD.²⁶⁷ Stoga se logično nameće pitanje što je uzrokom očiglednih razlika u vrijednostima ukupnog tau proteina u bolesnika s AB naspram bolesnika s VaD u gore navedenim istraživanjima. Jedan od razloga mogla bi biti činjenica što su u akutnom moždanom udaru vrijednosti tau proteina u likvoru povišene, a najviše vrijednosti su izmjerene otprilike tri tjedna nakon moždanog udara, da bi se zatim postupno smanjivale kroz narednih 3-5 mjeseci.²⁶⁵ Obzirom da se neuroradiološka obrada mozga (CT, MR) u sklopu obrade VaD češće izvodi prije lumbalne punkcije, također se može pretpostaviti kako su povišene vrijednosti ukupnog tau proteina u likvoru bolesnika s

VaD opisane u manjem broju studija posljedica mogućeg ponovljenog ali inaparentnog moždanog udara (koji se nije očitovao jasnim dodatnim kliničkim simptomima). To se posebno odnosi na one bolesnike kod kojih je od ranije postojao žarišni neurološki deficit, a pomoću HIS ljestvice se nisu kasnije evidentirale značajne promjene. Stoga se također postavlja i pitanje bi li se prije same lumbalne punkcije u bolesnika s VaD trebala uvijek ponoviti i neuroradiološka obrada.

Uspoređujući razine biološkog biljega p-tau181 u likvoru između ispitivanih skupina našeg istraživanja (AB, VaD, VaD + AB, KONT) statistička značajnost dobivena je usporedbom skupine AB s kontrolnim ispitanicima, bolesnika s VaD napram kontrolnih ispitanika te usporedbom skupine bolesnika s VaD + AB naspram kontrolnih ispitanika, no ta se posljednja navedena značajnost izgubila nakon Bonferonijeve korekcije. Biološki biljeg p-tau181 nije se pokazao statistički značajan ni u usporedbi AB *versus* VaD, niti u skupini VaD *versus* VaD+AB. Blennow i suradnici²⁶² među prvima su objavili da su ukupni tau i p-tau181 povišeni u AB. Slične rezultate poslije njih objavili su Nagga i suradnici²⁶⁸ 2002. godine, a potom su 2003. godine Schönknecht i suradnici²⁶⁹ objavili da se razina ukupnog i p-tau181 ne razlikuje bitno u bolesnika s početnom i manifestnom AB. Ipak, u usporedbi bolesnika s AB *versus* bolesnika s VaD, uočene su niže vrijednosti ukupnog i p-tau181 u pacijenata s VaD. Razina p-tau181 nije se u navedenom radu značajno razlikovala u bolesnika s VaD i kontrola što je potvrdilo pretpostavku da je p-tau181 u korelaciji s neurofibrilarnom patologijom AB, dok je ukupni tau protein biljeg sveukupnog oštećenja neurona.^{242,267,269} U radu Lewczuka i suradnika uspoređivan je fosforilirani oblik tau proteina p-tau181 s drugim poznatim biljezima poput A β 42 u likvoru te je na temelju dobivenih rezultata zaključeno da njihova istovremena upotreba povisuje osjetljivost i specifičnost zaživotne dijagnoze AB u dementnih bolesnika.²⁷⁰ Rezultate koji su uglavnom u suglasju s našima prikazali su i Ravaglia i suradnici.²⁷¹ U njihovom radu također je pokazana visoka razlikovna snaga p-tau181 proteina u razlikovanju dementnih bolesnika od zdravih kontrola (specifičnost je iznosila 100%), no p-tau181 se nije pokazao koristan u razlikovanju različitih vrsta demencije, a to se posebno odnosilo na nemogućnost razlikovanja AB od VaD.²⁷¹

Praćenjem razina p-tau199 te njihovom usporedbom između ispitivanih skupina našeg istraživanja (AB, VaD, VaD + AB, KONT) rezultati t-testa su pokazali

značajne razlike u vrijednostima p-tau199 između bolesnika s AB i skupine kontrolnih ispitanika, no nakon primjene Bonferronijeve korekcije (zbog višestrukih usporedbi), ta je razlika izgubila statističku značajnost. Usporedba skupine bolesnika s VaD i VaD + AB pomoću p-tau199 nije pokazala statističku značajnost. Takav je rezultat podudaran s nekim ranijim studijama.²⁷²⁻⁻²⁷⁴ Ipak, u literaturi su objavljeni i rezultati u suprotnosti s našima. Tako su npr. Itoh i suradnici u jednom velikom multicentričnom ispitivanju potvrdili ne samo da je p-tau199 povišen u bolesnika s AB, već da je on bio dobar biološki biljeg u dijagnostici AB neovisno o godinama, spolu, stupnju demencije i broju ε4 alela gena za apolipoproteinE.²⁷⁵

Prateći broj bodova na MMSE ljestvici, očekivano su bolesnici s AB, VaD, te VaD + AB imali niži broj bodova u odnosu na zdrave kontrolne ispitanike, a početna statistička značajnost u razlici broja MMSE bodova između AB skupine naspram VaD nije više bila značajna nakon primjene Bonferronije korekcije. MMSE se koristi u dijagnostici demencije još od 1975. godine i s relativno dobrom osjetljivošću i do 80%²⁷⁶ može ukazati na razvoj sindroma demencije³, no poznato je da demografske varijable, kao što su utjecaj dobi i nižeg stupnja obrazovanja mogu nepovoljno utjecati na pouzdanost rezultata dobivenog pomoću MMSE.²⁷⁷⁻²⁷⁹ Bryant i suradnici pokazali su da je potrebno obratiti posebnu pozornost ne samo na niži, nego i na viši stupanj obrazovanja te da bi sve pacijente s trajanjem edukacije duljom od 16 godina trebalo uputiti na dodatna neuropsihološka testiranja ukoliko imaju broj bodova niži od 27 (a ne 24 gdje je uobičajeno postavljena granica za sindrom demencije za cijelu populaciju), budući da kod takvih osoba postoji povećan rizik kognitivnog deficita i razvoja demencije (drugim riječima, kod njih 3 MMSE boda manje od maksimalnog znače veći gubitak kognitivnih sposobnosti nego što je to puno veći gubitak bodova kod „prosječne“ osobe u nekoj populaciji).²⁸⁰ U tom je smislu 2012. godine objavljen jedan zanimljiv rad naših autora (Boban i suradnici).²⁸¹ U tom istraživanju je testirano 217 kognitivno zdravih ispitanika i 127 ispitanika sa blagim kognitivnim deficitom ili sindromom demencije, a u analizi rezultata je uzet u obzir i stupanj obrazovanja. Zbog statistički značajnog utjecaja broja godina formalnog obrazovanja na dobivene rezultate zaključeno je kako bi se radi poboljšavanja procjene izgleda za nastanak demencije u pojedinog ispitanika uvijek bilo dobro provesti standardizaciju i validaciju MMSE testa za određenu populaciju, a ispitanik uputiti na dodatna testiranja u specijalizirane odjele (*memory clinic*) koji se bave demencijom.²⁸¹

Unatrag nekoliko godina, posebno za bolesnike sa suspektnom VaD sve je više u upotrebi *Montreal Cognitive Assessment* skala, MoCA.²⁸² MoCA je sveobuhvatan test u procjeni glavnih kognitivnih domena, uključujući izvršne sposobnosti, kratkotrajno pamćenje, jezične sposobnosti i vidno-prostorno procesiranje. S obzirom na kvalitetu i adekvatnost MoCA testiranja, radna skupina NINDS-CSN Standarda za harmonizaciju²⁸³ (*NINDS-CSN VCI Harmonization Standards*) preporučila je za epidemiološke studije i klinička ispitivanja upotrebu kraće verzije MoCA testa koja ispituje dvanaest domena. Feritas i suradnici su 2012. godine pokazali da je MoCA valjan, pouzdan i osjetljiv test za otkrivanje kognitivnog oštećenja u VaD, a u usporedbi s MMSE superioran u pogledu dijagnostike i točnosti (napose u odnosu na gornji dio ljestvice), potvrđujući njegov veliki potencijal i korisnost za kratku kognitivnu procjenu VaD bolesnika.²⁸⁴ MoCA se pokazao i kao dobar i osjetljiv test i u graničnim područjima normalnog starenja, blagog kognitivnog deficita i blage demencije. Naime, MMSE ima ograničen dinamički raspon za normalne pojedince tako da osobe u pretkliničkom stadiju demencije ili s blagim kognitivnim poremećajem mogu postići rezultat veći od 24 boda, posebno zbog slabije mogućnosti testiranja izvršnih funkcija koje nedostaju u MMSE, a MoCA ih ima. Osim toga, MoCA test se pokazao izvrstan za otkrivanje blagog kognitivnog poremećaja u nepismenih starijih osoba i u onih s niskom razinom obrazovanja. U 15-tak minuta koliko test traje može se ispitati više kognitivnih domena nego s MMSE, a jednostavan je za primjenu i tumačenje.²⁸⁵⁻²⁸⁷

Do fosforilacije tau proteina u AB može doći na bilo kojoj serinskoj ili treoninskoj hidroksilnoj skupini. Ipak, dugogodišnja istraživanja raspodjele različitih hiperfosforiliranih oblika tau proteina vezanih uz pojedini stadij AB pokazala su da je hiperfosforilacija na određenom epitopu karakteristična za pojedini stadij AB.²⁸⁸ Tako se npr. hiperfosforilacija na treoninima 181 i 231 događa u vrlo ranom stadiju bolesti i prethodi nastanku neurofibrilarnih snopića kada se u citoplazmi nalaze još samo punktiformne unutarstanične nakupine tau proteina, dok se fosforilacija tau proteina na serinu 199 događa u kasnijim stadijima AB kako unutar tako i izvan neurofibrilarnih snopića.²⁸⁹ Prema tome, razina samog p-tau u likvoru trebala bi odražavati fosforilacijsko stanje tau proteina odnosno vjerojatan nalaz neurofibrilarnih snopića u mozgu bolesnika s AB na obdukciji. Već je spomenuto da je ukupni tau u likvoru značajno povišen u bolesnika s CJB²⁶⁶ no većina bolesnika s

CJB ima normalni ili blago povišen p-tau u likvoru.²⁹⁰ U većoj skupini bolesnika s CJB i drugim demencijama, nađeno je da međusobni odnos p-tau i ukupnog tau može dobro razlikovati CJB od drugih neurodegenerativnih bolesti i stanja.²⁹⁰ Isto tako, razina ukupnog i p-tau proteina u likvoru je normalna kod nekih važnih diferencijalnih dijagnoza kao što su Parkinsonova bolest i depresija.²³³ Kombinacija bioloških biljega u većini slučajeva daje bolje dijagnostičke mogućnosti nego što to može pojedini biološki biljeg.²⁹¹ U jednoj je domaćoj pilot studiji provedenoj na 39 bolesnika zaključeno da se uz pomoć ukupnog tau te p-tau181 i p-tau199 može dobro razlikovati rana AB od zdravih kontrolnih ispitanika kao i od drugih tipova demencija, posebno FTD, DLB i VaD²⁹². Slično su potvrdili Hampel i suradnici.²⁹³ Itoh i suradnici opisali su pozitivnu korelaciju između ukupnog tau i p-tau199 u pacijenata s AB i drugih primarnih i sekundarnih taupatija,²⁷⁵ iako ista nije nađena u radu Boban i suradnika.²⁹⁴ Kad smo u našem istraživanju uspoređivali međusobnu zavisnost ukupnog tau proteina *versus* p-tau181, ukupni tau *versus* p-tau199 te p-tau181 *versus* p-tau199 korištenjem Pearsonovog i Spearmanovog koeficijenta korelacije u skupini bolesnika s AB u sve tri usporedbe je dobivena statistička značajnost, dok u zdravih kontrolnih ispitanika nije nađena međusobna zavisnost navedenih proteina. Usporedba međusobne ovisnosti navedenih proteina pomalo je neočekivano u našem istraživanju pokazala statističku značajnost i u skupini pacijenata s VaD, ali ne i u skupini VaD + AB, možda zbog vrlo malog broja ispitanika u toj posljednjoj skupini.

U našem istraživanju pratili smo osjetljivost i specifičnost bioloških biljega: ukupnog tau proteina, fosforiliranih tau proteina p-tau181 i p-tau199, te FS (ukupni tau, p-tau181, p-tau199) za četiri skupine ispitanika (AD, VaD, VaD + AB, KONT) korištenjem ROC krivulje kao što je prikazano u rezultatima na **Slikama 12-23** te u **Tablici 11**. Osim toga, određivana je izlučna vrijednost za svaki od navedenih bioloških biljega. Pri određivanju osjetljivosti i specifičnosti koristili smo Preporuke radne skupine za biomarkere Alzheimerove bolesti iz 1998. godine (*Recommendations of a consensus report for useful (ideal) biomarkers of AD*) pri čemu je specifičnost i osjetljivost postavljena na 85% ili više.²⁹⁵ Prema tim preporukama, idealan bi biljeg bio onaj koji zadovoljava specifičnost i osjetljivost najmanje 75% do 85%.²⁹⁵ Idealan biljeg u razlikovanju bolesnika s AB i zdravih kontrolnih ispitanika u našem istraživanju bio je FS (ukupni tau, p-tau181, p-tau199) koji je imao specifičnost 77.8% i osjetljivost 77%. Najveću osjetljivost u toj skupini

imao je p-tau181 od 81.6%, p-tau199 i ukupni tau su toj skupini pokazali specifičnost od 77.8%, osjetljivost se nije pokazala značajna. U skupini bolesnika s VaD naspram zdravih kontrolnih ispitanika, karakteristike idealnog biljega za specifičnost i osjetljivost nije zadovoljio niti jedan ispitivani biljeg. Biološki biljeg p-tau181 pokazao je osjetljivost veću od 82.1%, a ukupni tau i FS (ukupni tau, p-tau181, p-tau199) pokazali su specifičnost od 77.8%. U skupini bolesnika s VaD + AB u odnosu na zdrave kontrolne ispitanike svi ispitivani biljezi pokazali su se idealnim, sa specifičnošću i osjetljivošću većom od 75%. U toj usporedbi p-tau181 je pokazao specifičnost od 100%, dok su ukupni tau i FS (ukupni tau, p-tau181, p-tau199) pokazali specifičnost od 94.4%; p-tau199 imao je specifičnost od 77.8%. Zaključno, svi ispitivani biljezi imali su osjetljivost veću od 75%.

U istraživanju smo određivali i izlučne vrijednosti za ukupni tau, p-tau181 i p-tau199. Kao što je prikazano u rezultatima u **Tablici 11**, najvišu izlučnu vrijednost imao je ukupni tau protein u skupini VaD + AB, praktički dvostruko višu nego skupine bolesnika s AB i VaD, dok je u te dvije skupine izlučna vrijednost ukupnog tau proteina bila podjednaka. Izlučna vrijednost za p-tau181 pokazala je iste karakteristike kao i ukupni tau, dakle u skupini VaD + AB izlučna vrijednost p-tau181 bila je dvostruko viša nego u ispitanika samo s AB i samo s VaD no ispitanici s VaD imali su niže izlučne vrijednosti p-tau181 nego ispitanici s AB. Izlučne vrijednosti za p-tau199 bile su relativno podjednake u sve tri skupine ispitanika. Izlučna vrijednost za FS (ukupni tau, p-tau181, p-tau199) u skupini bolesnika s VaD + AB bila je ponovno dvostruko viša u skupini VaD + AB u odnosu na skupini ispitanika s AB i VaD, čije su vrijednosti bile podjednake.

S obzirom na to da nismo u potpunosti bili zadovoljni rezultatima dobivenim određivanjem ukupnog tau, p-tau181 i p-tau199 u razlikovanju AB i VaD, dodatno smo korištenjem ELISA testa odredili i razine p-tau231. Napravljen je i FS kombinacijom svih ispitivanih bioloških biljega te kombinacijom MMSE i p-tau231, koji je pokazao izvrsnu diskriminativnost AB u odnosu na VaD. U našem istraživanju, izmjerena razina p-tau231 je bila statistički značajno viša u bolesnika s AB u odnosu na zdrave kontrolne ispitanike, kao i u pacijenata s VaD u odnosu na zdrave kontrolne ispitanike. Nije bilo statističke značajnosti u koncentraciji p-tau231 u cerebrospinalnoj tekućini izuzetoj lumbalnom punkcijom u razlikovanju bolesnika s AB i VaD, kao niti u razlikovanju bolesnika s VaD+AB napram zdravih kontrolnih ispitanika, te skupina AB i VaD + AB, kao niti bolesnika s VaD napram VaD + AB.

Uspoređivanjem FS (ukupni tau, p-tau181, p-tau199 i p-tau231) između ispitivanih skupina, dobivena je statistička značajnost u skupini AB naspram zdravih kontrolnih ispitanika, dok se uslijed višestrukih usporedbi početna statistička značajnost u skupini VaD naspram zdravih kontrolnih ispitanika izgubila nakon Bonferronijeve korekcije. Kada je analiziran FS (p-tau231 i MMSE) dobivena je statistička značajnost pri razlikovanju bolesnika s AB *versus* zdravih kontrolnih ispitanika te bolesnika s VaD *versus* zdravih kontrolnih ispitanika. Ipak, najznačajnijim smatramo to što se FS (p-tau231 i MMSE) pokazao statistički značajan u razlučivanju ispitanika s AB u odnosu na VaD, kao i u razlučivanju ispitanika s VaD *versus* skupine bolesnika s miješanom demencijom (AB+VaD). Istraživanjem međusobne zavisnosti p-tau231 i ukupnog tau proteina, p-tau181 i p-tau199 u skupini bolesnika s AB dobivena je statistička značajnost za p-tau181 vs p-tau231, te za p-tau199 vs p-tau231. U skupini bolesnika s VaD statistička značajnost je dobivena u međusobnoj zavisnosti ukupnog tau i p-tau231, te za p-tau181 i p-tau231. Za skupinu bolesnika s VaD + AB nisu dobiveni statistički značajni rezultati niti za jedan tau protein. To je u rezultatima prikazano u **Tablici 18** i **Slikama 27-29**. U našem istraživanju nismo dobili statističku značajnost ispitivanjem međusobne zavisnosti razine p-tau231 i broja bodova na MMSE ljestvici. Prateći osjetljivost i specifičnost p-tau231 pokazano je da je njegova specifičnost i osjetljivost bila veća od 75% pri razlikovanju ispitanika s AB od zdravih kontrolnih ispitanika (osjetljivost 77.6% i specifičnost 77.8%); u skupini bolesnika s VaD u odnosu na zdrave kontrolne ispitanike osjetljivost je bila 80% i specifičnost 77.8%, a u skupini bolesnika s AB+VaD specifičnost je bila 94.4%, a osjetljivost 66.7%. FS (ukupni tau, p-tau181, p-tau199 i p-tau231) je pokazao specifičnost koja zadovoljava karakter idealnog biomarkera za sve ispitivane skupine: najvišu 94.4% u skupini VaD+AB *versus* zdravi kontrolni ispitanici, 88.9% u skupini AB *versus* zdravi kontrolni ispitanici te 77.8% u skupini VaD *versus* zdravi kontrolni ispitanici. Osjetljivost veća od 75% za FS (ukupni tau, p-tau181, p-tau199 i p-tau231) nije dobivena niti u jednoj ispitivanoj skupini. FS (p-tau231 i MMSE) imao je osjetljivost od 90% u razlikovanju ispitanika s AB u odnosu na zdrave kontrolne ispitanike, ali mu je specifičnost bila manja od 75%. U skupini VaD *versus* zdravi kontrolni ispitanici, FS (p-tau231 i MMSE) je imao osjetljivost od 80% i specifičnost 85%, što je dobar rezultat. Za ispitanike sa VaD + AB *versus* zdravi kontrolni ispitanici FS (p-tau231 i MMSE) imao je osjetljivost od 90%, ali mu je specifičnost bila svega 55%. Izlučna vrijednost

za p-tau231 nije pokazala značajnost potrebnu za razlikovanje bolesnika s AB i VaD, ali je bila značajno viša u bolesnika s VaD + AB u odnosu na AB ili VaD.

P-tau231 je biljeg koji se prema dosadašnjim ispitivanjima pokazao najviše karakterističan upravo za patološke promjene u AB. Vrlo rano se može detektirati u likvoru bolesnika s AB, a sama koncentracija p-tau231 u dobroj je korelaciji s progresijom bolesti u pojedinog bolesnika s AB.²⁹⁶ Bürger i suradnici pokazali su da je razina p-tau231 bila povišena u bolesnika s MCI te da dobro korelira i s gubitkom bodova mjereno MMSE ljestvicom u ispitanika s MCI, tj. napredovanjem bolesti.²⁹⁷ Hampel i suradnici su pokazali umjereno dobru diskriminativnu snagu p-tau (p-tau231, p-tau181, p-tau199) u razlikovanju bolesnika s AB u odnosu na zdrave kontrolne ispitanike, kao i u odnosu na druge vrste primarne uzroke demencije: FTD DLB, te VaD. Nažalost, zbog premalog broj ispitanika s VaD ta diskriminativna vrijednost p-tau za VaD nije statistički dokazana.²⁹⁸ Longitudinalna pilot studija objavljena 2016. godine Wanga i suradnika pokazala je kako postoji statistički značajna razlika u koncentraciji ukupnog tau proteina i p-tau proteina u umjerenoj do teškoj AB u odnosu na VaD, posebno ukoliko se radilo o teškoj AB. U toj studiji nije nađena statistička značajnost u vrijednostima ukupnog tau i p-tau231 kao niti broja MMSE bodova nakon 6 mjeseci praćenja u odnosu na početna mjerenja.²⁹⁹ Razlika u odnosu na naše rezultate možda je nastala zbog činjenice što su naši ispitanici uglavnom imali blagu do umjerenu demenciju (mjereno brojem MMSE bodova) u odnosu na ispitivanje Wanga i suradnika (koji su pretežno ispitali bolesnike s umjerenim do težim stupnjem demencije).²⁹⁹ Relativno mali vremenski razmak od 6 mjeseci u takvoj jednoj sporoprogresivnoj bolesti kao što je AB također je možda bio razlogom izostanka značajnijih pomaka u razinama mjerenih biomarkera.

Velik je praktični izazov odrediti točan uzrok demencije u svakog pojedinog bolesnika, a poseban je izazov postaviti dijagnozu u ranoj fazi bolesti kad su klinički simptomi minimalno izraženi i kad bi bolesnik imao najviše koristi od liječenja. Već spomenuti klinički kriteriji su nam važni i od velike koristi, isto kao i slikovna obrada (CT/MR) bolesnika, no sve to često nije dovoljno pouzdano postavljanje dvaju najčešćih primarnih uzroka demencije, AB i VaD.^{300,301} Nikakva dodatna obrada niti biološki biljezi vjerojatno nam ne bi ni bili potrebni kad bismo uvijek imali samo "čistu" kliničku i neuropatološku sliku AB i "čistu" kliničku i neuropatološku sliku

VaD. Jasna razlika između te dvije vrste demencije je moguća kad imamo "čistu" VaD definiranu s postepenom ("step-by-step") progresijom, značajnim oštećenjem izvršnih funkcija, brojem bodova na HIS skali većim od 4, žarišni neurološki ispad, te podatak o rizičnim čimbenicima za moždani udar uz značajna kortikalna i subkortikalna oštećenja vidljiva slikovnom obradom mozga.^{302,303} No, razlikovanje je puno teže kad postoji komorbiditet s obzirom na to da se u bilo kojem stadiju AB može javiti CAA, a mnogi stariji bolesnici s AB imaju i infarkte u bijeloj tvari mozga. Stoga izraz "miješana demencija" uključuje različite entitete koji mogu varirati od bilateralnih kortikalnih infarkta mozga pa sve to subkortikalnih lakunarnih infarkta. U novijim studijama se zbog toga bolesnici s jasnom kliničkom slikom AB, a sa značajnim vaskularnim lezijama mozga opisuju kao AB s cerebrovaskularnom bolesti.³⁰⁴ S druge strane VaD se prekomjerno dijagnosticira kad se rutinski CT ili MR mozga koriste u kontekstu standardnih dijagnostičkih kriterija.³⁰⁵ U jednoj prospektivnoj longitudinalnoj studiji istraživanja bioloških biljega demencije koju su provodili Engelborgs i suradnici praćeno je 72 bolesnika. Kod 28 bolesnika postavljena je dijagnoza vjerojatne ili moguće VaD na temelju CT ili MR mozga. Sedamdeset jedan ispitanik iz te studije je obduciran, a samo kod 5 od 28 mozgova je potvrđena dijagnoza VaD. To dodatno ukazuje na ozbiljnost prekomjernog dijagnosticiranja VaD samo na temelju slikovne obrade mozga i naglašava važnost korištenja bioloških biljega.³⁰⁶

Iz svega navedenog može se zaključiti kako korištenje kombinacije bioloških biljega daje bolje rezultate nego upotreba svakog pojedinog biološkog biljega samog za sebe.^{307,308} U radovima u kojima se ispitala kombinacija p-tau181, p-tau199 i p-tau231 korištenjem ELISA metode, praćenjem 1420 bolesnika s AB i 708 kognitivno zdravih kontrolnih ispitanika postignuta je visoka osjetljivost između 81 i 91%, dok su se u studijama gdje su uspoređivani biljezi p-tau181, p-tau199 i p-tau231 u bolesnika s AB, DLB, FTD i VaD te skupinom ispitanika s drugim neurološkim bolestima, sva tri navedena biljega pokazala podjednako dobra u razlikovanju bolesnika s AB od drugih bolesti i zdravih kontrolnih ispitanika, uz manje razlike koje su izdvojile p-tau231 kao najbolji za razlikovanje skupina bolesnika s AB i FTD te p-tau181 kao najbolji u razlikovanju skupina bolesnika s AB i DLB.³⁰¹

Rezultati do sada provedenih istraživanja međusobne zavisnosti bioloških biljega ukupnog tau, p-tau181, p-tau199 i p-tau231 u razlikovanju AB i VaD nisu se

pokazali konzistentnima. U meta-analizi jedanaest radova koju su proveli Van Harten i suradnici 2011. godine na 249 bolesnika s VaD i 265 bolesnika s AB, VaD bolesnici imali su statistički značajno višu koncentraciju ukupnog tau proteina u likvoru u odnosu na zdrave kontrolne ispitanike. Za p-tau bilo je dostupno samo 5 radova u kojima nije pokazana navedena statistička značajnost. Podaci u tim radovima su bili nedovoljni za određivanje specifičnosti i osjetljivosti ukupnog tau i p-tau za bolesnike s VaD naspram zdravih kontrolnih ispitanika.³⁰⁹ Isti autori su na temelju 23 rada u kojima je praćeno 503 bolesnika s VaD i 1312 bolesnika s AB zaključili da bolesnici s VaD imaju statistički značajno niže koncentracije ukupnog tau u odnosu na bolesnike s AB. Na temelju analize 306 bolesnika s VaD i s 1048 bolesnika s AB dobivena je prosječna osjetljivost od 73% (raspon: 60-86%) i prosječna specifičnost od 86% (raspon: 80-90%). Srednja vrijednost p-tau analizirana na 165 bolesnika s VaD i 333 bolesnika s AB bila je niža u bolesnika s VaD nego u bolesnika s AB, pri čemu je prosječna osjetljivost bila 88% (72-92%), a prosječna specifičnost 78% (68-88%)³⁰⁹ Bolesnici s AB u kojih su na MR mozga nađeni hiperintenziteti bijele tvari mozga imali su vrijednosti ukupnog tau i p-tau u likvoru povišene kao i bolesnici s AB.³⁰⁹ Liu i suradnici su 2014. godine objavili meta-analizu razina tau proteina u likvoru u svrhu diferencijalne dijagnoze AB i VaD u kineskoj populaciji. Od ukupno 139 studija izdvojeno ih je 16 za meta-analizu, u kojoj je analizirano 370 bolesnika s VaD, 476 s AB, te 418 zdravih kontrolnih ispitanika. Rezultati su ukazali na statistički značajno više vrijednosti ukupnog tau proteina u likvoru bolesnika s AB u odnosu na VaD i zdrave kontrolne ispitanike, iako su i bolesnici s VaD imali statistički značajno više vrijednosti ukupnog tau proteina u odnosu na zdrave kontrolne ispitanike. Ipak, te su vrijednosti bile niže kad su se uspoređivale s onima u bolesnika s AB.³¹⁰ U Hrvatskoj su biološke biljege u razlikovanju AB i VaD istraživali Boban i suradnici. Prema tim autorima, u ispitivanim skupinama ukupni tau razlikovao je bolesnike s AB u odnosu na VaD sa specifičnosti od 100%, a bolesnike s AB razlikovao je od zdravih kontrolnih ispitanika sa specifičnosti 91.7%. Biomarker p-tau199 pokazao je specifičnost u razlikovanju AB i VaD od 75%. Autori su zaključili da ukupni tau i p-tau199 mogu služiti kao pouzdan biljeg za razlikovanje AB od VaD, dok p-tau181 nije pokazao zadovoljavajuće rezultate. Obzirom da je u tu pilot studiju bilo uključeno samo 12 bolesnika s AB, 9 s VaD i 12 zdravih kontrolnih ispitanika, sami autori su predložili

provođenje ispitavanja na većem broj ispitanika kako bi se dobili pouzdaniji rezultati.³¹¹

Prije našeg istraživanja napravljeno je preliminarno istraživanje kako bi se testom snage (*power test*) utvrdilo koliko bi bolesnika bilo potrebno da se potvrdi hipoteza. Iako je test snage pokazao da bi nam za to bilo dovoljno svega 13 bolesnika u svakoj skupini, mi smo broj ispitanika i povećali. Unatoč tome, tijekom samog ispitavanja pokazao je nekoliko nedostataka koji su sukladni nedostacima na koje u svojim radovima iste tematike upućuju i drugi autori. Naime, vrlo je teško u ranom stadiju bolesti točno prepoznati o kojoj se vrsti demencije radi, a posebno je to problem kod prepoznavanja VaD i AB s obzirom na to da, osim kod "čiste" VaD, klinička prezentacija bolesti može biti vrlo slična. S obzirom na to da se dodatno radi i o starijoj populaciji, velik broj bolesnika kod kojih klinički zaključujemo da se radi o AB ima rizične čimbenike za nastanak cerebrovaskularne bolesti i hiperintezitete u bijeloj tvari mozga, odnosno, kao što je ranije u raspravi spomenuto, radi se o bolesnicima s AB s cerebrovaskularnom bolesti ili o bolesnicima s miješanom demencijom. Tu se odmah nameće nedostatak postmortalne histopatološke verifikacije dijagnoza postavljenih temeljem kliničkih kriterija. Smatramo da bi se taj problem mogao minimalizirati identičnom obradom svakog pojedinog bolesnika kod kojeg postavimo sumnju na razvoj demencije (klinički pregled, slikovna obrada mozga, laboratorijska obrada, neuropsihološko testiranje, pridržavanje dostupnih kriterija). NINDS-ADRDA kriteriji, npr. imaju visoku osjetljivost, no samo umjereno visoku specifičnost pa bi se opširnijom dijagnostičkom obradom specifičnost dijagnoze mogla povećati.³¹² Još jedan problem u uspoređivanju rezultata studija je korištenje različitih ELISA testova za pojedini biološki biljeg i korištenje različitih ELISA.³¹³ Prikupljanje likvora je invazivna pretraga koja nosi svoje komplikacije, no ukoliko postupak provodimo prema smjernicama i sa sterilnim priborom, rizici su minimalni. Ipak, invazivnost pretrage ima ograničenje u tome što se neki bolesnici, odnosno obitelji bolesnika, ne odlučuju za istu, a tek ih neznatan broj pristaje na ponovljenu lumbalnu punkciju koja bi nam mogla dati dodatne informacije o biološkim biljezima u određenom vremenskom razdoblju tj. otkriti nam dinamiku nastajanja patoloških promjena odnosno brzinu progresije bolesti. Sam postupak uzimanja likvora uglavnom je standardiziran i većina se istraživanja pridržava preporuka vremena uzimanja

likvora, mjesta lumbalne punkcije, uzimanja, obrade i čuvanja likvora. Usprkos tome, do sada izlučne vrijednosti pojedinog tau proteina nisu standardizirane, te su u različitim istraživanjima dobivene različite vrijednosti. Međunarodne standarde je teško ustanoviti budući da se radi ne samo o posebnostima laboratorija i korištenih testova već i o posebnostima populacije koja se istražuje, o trajanju demencije i o stadiju demencije u kojem se lumbalna punkcija provodi.²⁹⁹

Prema našim spoznajama, ovo je prva studija uopće koja je koristila dostupne tau biološke biljege: ukupni tau, p-tau181, p-tau199 i p-tau231 uključujući FS, u dobno i MMSE podudarnim skupinama bolesnika s AB i VaD. Dobiveni rezultati nisu u potpunosti potvrdili hipotezu da je uz pomoć tih biljega moguća jasna diferencijacija dijagnoza AB i VaD s osjetljivosti i specifičnosti većom od 75%, no donijeli su nekoliko jasnih zaključaka koji su opisani u sljedećem poglavlju.

8. ZAKLJUČCI

1. Razina ukupnog tau proteina bila je statistički značajno povišena u skupine ispitanika s AB u odnosu na skupinu zdravih kontrolnih ispitanika kao i na skupinu ispitanika s VaD + AB i VaD, no nije pokazao statističku značajnosti u razlikovanju bolesnika s AB, VaD ili VaD + AB.
2. Izmjerena razina biološkog biljega p-tau181 je sa statističkom značajnosti razlikovala skupinu bolesnika s AB od skupine zdravih kontrolnih ispitanika, kao i skupine ispitanike s VaD u odnosu na skupinu zdravih kontrola, no nije pokazala statističku značajnost u razlikovanju skupina bolesnika s AB, VaD ili VaD + AB.
3. Izmjerena razina biološkog biljega p-tau199 nije pokazala statističku značajnost u razlikovanju skupina bolesnika s AB, VaD ili VaD + AB.
4. Broj bodova dobiven pomoću MMSE razlikovao se značajno između skupina ispitanika s AB, VaD ili VaD + AB u odnosu na skupinu zdravih kontrolnih ispitanika, no broj MMSE bodova nije imao statističku značajnost u razlikovanju skupina bolesnika s AB, VaD ili VaD + AB.
5. Kombinacijom bioloških biljega ukupni tau, p-tau181 i p-tau199 moglo se pouzdano razlikovati skupinu ispitanika s AB od skupine zdravih kontrolnih ispitanika te skupine ispitanika s VaD od skupine zdravih kontrolnih ispitanika.
6. Jedini „idealni“ biljeg u razlikovanju skupine bolesnika s AB od skupine zdravih kontrolnih ispitanika u ovom istraživanju bio je FS (ukupni tau, p-tau181, p-tau199) zato jer je navedene skupine ispitanika razlikovao s osjetljivosti od 77% i specifičnosti od 77.8%.
7. Idealni biljeg za razlikovanje ispitanika s VaD i zdravih kontrolnih ispitanika u ovom istraživanju nije nađen.

8. U skupini ispitanika s VaD + AB u odnosu na skupinu zdravih kontrolnih ispitanika, karakteristike idealnog biljega imali su FS (ukupni tau, p-tau181, p-tau199), ukupni tau, p-tau181 i p-tau199.
9. Izlučne vrijednosti ukupnog tau proteina, p-tau181 i p-tau199 određene u ovom istraživanju nisu imale statističku značajnost u razlikovanju bolesnika s VaD i AB.
10. Prosječna razina biološkog biljega p-tau231 bila je statistički značajno viša u skupine bolesnika s AB u odnosu na skupinu zdravih kontrolnih ispitanika, kao i kod skupine bolesnika s VaD u odnosu na skupinu zdravih kontrolnih ispitanika.
11. FS (ukupni tau, p-tau181, p-tau199 i p-tau231) je sa statističkom značajnošću razlikovao skupinu ispitanika s AB u odnosu na skupinu zdravih kontrolnih ispitanika.
12. FS (p-tau231 i MMSE) je sa statističkom značajnošću razlikovao skupinu ispitanika s AB od skupine zdravih kontrolnih ispitanika, kao i skupinu ispitanika s VaD od skupine zdravih kontrolnih ispitanika.
13. FS (p-tau231 i MMSE) je sa statističkom značajnošću razlikovao skupinu ispitanike s AB od skupine ispitanika s VaD, a osjetljivost za diferencijaciju tih dviju skupine pokazala je karakter idealnog biljega.
14. Biološki biljeg p-tau231 pokazao je karakteristike idealnog biljega za razlikovanje skupine bolesnika s AB u odnosu na skupinu zdravih kontrolnih ispitanika kao i za razlikovanje skupine bolesnika s VaD u odnosu na skupinu zdravih kontrolnih ispitanika.
15. FS (ukupni tau, p-tau181, p-tau199 i p-tau231) je pokazao specifičnost koja je zadovoljavala karakter idealnog biomarkera za sve ispitivane skupine.
16. Preporuča se točno definiranje odnosna neuroradiološke obrade mozga i lumbalne punkcije kako bi se izbjegla mogućnost da se tau proteini u likvoru određuju u subkliničkom moždanom udaru, obzirom da su tau proteini značajno povišeni u razdoblju od 3-5 tjedana pa sve do 3 mjeseca nakon moždanog udara.

17. Treba nastojati provesti standardizaciju izlučnih vrijednosti tau proteina u likvoru definiranjem vremena u kojem se izvodi lumbalna punkcija, a u ovisnosti od trajanja i stadija demencije te ELISA testova koji se koriste.

9. SAŽETAK NA HRVATSKOM JEZIKU

Demencije su jedan od glavnih javnozdravstvenih problema širom svijeta. Najčešći primarni uzrok sindroma demencije je Alzheimerova bolest (AB), nakon čega slijedi vaskularna demencija (VaD). U kliničkoj praksi je vrlo teško razlikovati AB i VaD, posebno u ranijim stadijima bolesti. Budući da se VaD može spriječiti djelovanjem na čimbenike rizika, a osim toga javljaju se novi lijekovi koji bi mogli usporiti napredovanje AB, jako je važna što ranija točna dijagnoza. Dostupni klinički kriteriji nisu pokazali dovoljnu osjetljivost i specifičnost u razlikovanju AB i VaD, stoga je potrebno pronaći bolje biološke biljege. Cilj ove studije bio je procijeniti razinu ukupnog tau proteina u likvoru i tau proteina fosforiliranih na treoninu 181 (p-tau181), serinu 199 (p-tau199) i treoninu 231 (p-tau231) te mogućnost njihovog korištenja u ranom razlikovanju AB i VaD. Istraživanje je obuhvatilo 152 bolesnika s AB (*Mini-Mental State Examination*, MMSE 15-26), 28 bolesnika s VaD, četiri bolesnika s "mješovitom demencijom" (VaD + AD) i 18 zdravih kontrola. Rezultati su pokazali da svi ispitivani biološki biljezi mogu razlikovati bolesnike s AB i VaD od zdravih kontrolnih ispitanika. Međutim, niti jedan od ispitivanih bioloških biljega nije imao odgovarajuću statističku snagu razlikovanja skupine bolesnika s AB od skupine bolesnika s VaD. Jedino je pomoću združenog faktorskog skora (FS) p-tau231 i MMSE bilo moguće uspješno razlikovanje skupine bolesnika s AD od onih s VaD sa dostatnom statističkom značajnošću ($p < 0,05$), te osjetljivošću većom od 75%. To ukazuje kako FS (p-tau231 i MMSE) ima velik potencijal u razlikovanju AB i VaD još u ranim stadijima bolesti, što treba potvrditi u budućim istraživanjima na još većem broju bolesnika.

10. SUMMARY

Evaluation of measurement of total and phosphorylated tau proteins in cerebrospinal fluid for differentiation of Alzheimer's disease and vascular dementia

Spomenka Kidemet-Piskač (2017.)

Dementia is a major public health problem worldwide. The most common primary cause of dementia is Alzheimer's disease (AD) followed by vascular dementia (VaD). AD and VaD are often difficult to distinguish in their early stages in clinical practice. Because VaD can be prevented by acting on risk factors and new medications have emerged that could slow down the progression of AD, early accurate diagnosis is crucial. Available clinical criteria have not shown sufficient sensitivity and specificity in differentiating of AD and VaD, and better biological markers are needed. The aim of this study was to evaluate cerebrospinal fluid (CSF) levels of total tau protein, tau phosphorylated at threonine 181 (p-tau181), serine 199 (p-tau199), and threonine 231 (p-tau231) for their use in the early differentiation of AD and VaD. The study included 152 patients with AD (*Mini-Mental State Examination*, MMSE 15-26), 28 patients with VaD, four patients with "mixed dementia" (VaD + AD) and 18 healthy controls. The diagnostic accuracy of all investigated biomarkers showed that they may differentiate patients with AD and VaD from healthy control subjects. However none could differentiate patients with AD from patients with VaD. Only the compound factor score (FS) of p-tau231 and MMSE distinguished the patients with AD from those with VaD with statistical significance ($p < 0.05$), with a sensitivity higher than 75%. These data indicate that FS of p-tau231 and MMSE scores has a strong potential to provide early stage distinction between AD and VaD.

11. LITERATURA

1. Chertkow H, Howard HH, Feldman, Jacova C, Massoud F. Definitions of dementia and predementia states in Alzheimer's disease and vascular cognitive impairment: consensus from the Canadian conference on diagnosis of dementia. *Alzheimers Res Ther.* 2013;5(1):S2.
2. Nasreddin ZS, Phillips NA, Bédirian V, Charbonneau S, Whitehead V, Collin I, i sur. The Montreal Cognitive Assessment, MoCA: a brief screening tool for mild cognitive impairment. *J Am Geriatr Soc.* 2005;53:695-9.
3. Folstein M, Folstein SE, McHugh PR. „Mini-Mental State“: a practical method for grading the cognitive state of patient for the clinician. *J Psychiatr Res.* 1975;12:189-98.
4. Mohs RC, Knopman D, Petersen RC, Ferris SH, Ernesto C, Grundman M, i sur. Development of cognitive instruments for use in clinical trials of antidementia drugs: additions to the Alzheimer's Disease Assessment Scale that broaden its scope: the Alzheimer's Disease Cooperative Study. *Alzheimer Dis Assoc Disord.* 1997;11:13–21.
5. Berr C, Wancata J, Ritchie K. Prevalence of dementia in the elderly in Europe. *Eur Neuropsychopharmacol.* 2005;15:463-71.
6. Horton R. GBD2010: understanding disease, injury, and risk. *Lancet.* 2012;380(9859):2053–4.
7. Kalaria RN, Maestre GE, Arizagaetal R. Alzheimer's disease and vascular dementia indeveloping countries: prevalence, management, and risk factors. *Lancet Neurol.* 2008;7(9):812–26.
8. Ferri CP, Prince M, Brayne C, Brodaty H, Fratiglioni L, Ganguli M, i sur. Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *Lancet.* 2005;366(9503):2112–7.
9. Rizzi L, Rosset I, Roriz-Cruz M. Global Epidemiology of Dementia: Alzheimer's and Vascular Types. *BioMed Research International.* 2014. Article ID 908915
10. Sesley WW, Miller BI. Alzheimer's disease and other dementias. *Harrison's Neurology in Clinical Medicine* 3rd edition.
11. Lobo A, Launer LJ, Fratiglioni L, Andersen K, Di Carlo A, Breteler MM, i sur. Prevalence of dementia and major subtypes in Europe: A collaborative study of population-based cohorts. *Neurologic Diseases in the Elderly Research Group. Neurology* 2000;54:4-9.
12. Jellinger KA. The enigma od vascular cognitive disorder and vascular dementia. *Acta Neuropathol.* 2007;113(4):349-88.
13. Dening TR, Berrios GE. Vascular dementia. *Cerebrovascular disease: pathophysiology, diagnosis and managemnt.* Science Ltd. 1998:1126-44.
14. Roman GC: A historical review of the concept of vascular dementia: lessons from the past for the future. *Alzheimer Dis Assoc Disord.* 1999;13:54-8

15. Mast H, Tatemichi TK, Mohr JP. Chronic brain ischemia: the contributions of Otto Binswanger and Alois. *J Neurol Sci.* 1995;132:4-10.
16. Roman GC. Historical aspects: from Alzheimer to Binswanger. New York: Thieme. 1992:83-5.
17. Bowler J, Hachinski V. Vascular dementia. *Cerebrovascular Disease: pathophysiology, diagnosis and management.* Science Ltd. 1998:1126-44.
18. De la Torre JC. Alzheimer disease as a vascular disorder: nosological evidence. *Stroke.* 2002; 33:1152-62.
19. Erkinjuntti T, Roman GC, Chui H. Diagnostic criteria. *Vascular cognitive impairment.* Martin Dunitz. 2002:43-57.
20. Hachinski VC, Zihlka E, DuBoulay GH, McAllister VL, Marshall J. Cerebral Blood flow in dementia. *Arch Neurol.* 1975;32:623-7.
21. American Psychiatric Association. Diagnostic and statistical manual of mental disorders (IV-TR). 4. izd. Washington DC: American Psychiatric Publishing Inc; 2000.
22. McKhann G, Drachman D, Folstein M, Katzman R, Price D, Stadlan EM. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology* 1984;34:939-44.
23. Roman GC, Tatemichi TK, Erkinjuntti T, Cummings JL, Masdeu JC, Garcia JH, Amaducci L, Orgogozo JM, Brun A, Hofman A, i sur. Vascular dementia: diagnostic criteria for research studies. Report of the NINDS-AIREN International Workshop. *Neurology.* 1993;43(2):250-60.
24. Sorbi S, Hort J, Erkinjuntti T, Fladby T, Gainotti G, Gurvit H, i sur. EFNS-ENS Guidelines on the diagnosis and management of disorders associated with dementia. *Eur J Neurol.* 2012;19(9):1159-79.
25. World Health Organization. ICD-10: international statistical classification of diseases and related health problems. 10. izd. Geneva: World Health Organization; 2004.
26. Dubois, B, Feldman HH, Jacova, C, Cummings JL, Dekosky ST, Barberger-Gateau P, Delacourte A, i sur. Revising the definition of Alzheimer's disease: a new lexicon. *Lancet Neurol.* 2010;9:1118-27.
27. McKhann GM, Knopman DS, Chertkow H, Hyman BT, Jack Jr CR, Kawas CH, Klunk WE, i sur. The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease. Recommendations from The National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroup on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement.* 2011;7:263-9.
28. Gorelick PB, Scuteri A, Black SE, Decarli C, Greenberg SM, Iadecola C, i sur. Vascular contributions to cognitive impairment and dementia: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke.* 2011;42:2672-713.
29. Sachdev P, Kalaria R, O'Brien J, Skoog I, Alladi S, Black SE, i sur. Diagnostic criteria for vascular cognitive disorders: a VASCOG statement. *Alzheimer Dis Assoc Disord.* 2014;28(3):206-18.

30. Fratiglioni L, Launer LJ, Anderson K, Breteler MM, Copeland JR, Dartigues JF, i sur. Incidence of dementia and major subtypes in Europe: a collaborative study of population-based cohorts. Neurologic disease in the Elderly Research Group. *Neurology*. 2000;54:10-5.
31. Kuller LH, Lopez OL, Jagust WJ, Becker JT, DEKosky ST, Lyketsos C, i sur. Determinants of vascular dementia in the Cardiovascular Health Cognition Study. *Neurology*. 2005;64:1548-52.
32. Esiri MM, Wilcock GK, Morris JH. Neuropathological assessment of the lesions of significance in vascular dementia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1997;63:749-53.
33. Jellinger KA. The pathology of ischemic-vascular dementia: an update. *J Neurol Sci*. 2002;203-204:153-7.
34. Vinters HV, Ellis WG, Zaroy C, Zaias BW, Jagust WJ, Mack WJ, i sur. Neuropathologic substrates of ischemic vascular dementia. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2000;59:931-45.
35. Tomlinson BE, Blessed G, Roth M. Observations on the brains of demented old people. *J Neurol Sci*. 1970;11:205-42.
36. Erkinjuntti T, Benavente O, Eliasziw M, Munoz DG, Sulkaa R, Hatanen M, i sur. Diffuse vacuolization (spongiosis) and arteriolosclerosis in the frontal white matter occurs in vascular dementia. *Arch Neurol*. 1996;53:325-32.
37. Jellinger KA. Pathology and pathophysiology of vascular cognitive impairment: a critical update. *Panminerva Med*. 2004;46:217-26.
38. Del Ser T, Bermejo F, Portera A, Arredondo JM, Bouras C, Constantinidis J. Vascular dementia. A clinicopathological study. *J Neurol Sci*. 1990;96:1-17.
39. Erkinjuntti T, Hatanen M, Palo J, Sulkaava R, Paetau A. Accuracy of the clinical and postmortem neuropathological study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1998;51:1037-44.
40. Liu CK, Miller BI, Cummings JL, Mehringer CM, Goldberg MA, Howng SL, Benson DF. A quantitative MRI study of vascular dementia. *Neurology*. 1992;42:138-43.
41. Basso A, Capitani E, Luzzati C, Spinnler H. Intelligence and left hemisphere disease. The role of aphasia, apraxia and size of lesions. *Brain*. 1981;104:721-34.
42. Cummings JL, Benson DF. Psychological dysfunction accompanying subcortical dementias. *Annu Rev Med*. 1988;39:53-61.
43. Tatemichi TK, Sacktor N, Mayeux R. Dementia associated with cerebrovascular disease, other degenerative diseases, and metabolic disorders. In: Bick KL (ed) *Alzheimer's disease*. Raven Press, New York 1994:123-66.
44. Castaigne P, Lhermitte F, Buge A, Escourolle R, Hauw JJ, Lyon-Caen O. Paramedian thalamic and midbrain infarct: clinical and neuropathological study. *Ann Neurol*. 1981;10:127-48.
45. De Freitas GR, Bogousslavsky J. Thalamic infarcts. In: Bogousslavsky J (ed) *Subcortical stroke*, 2nd edn. Oxford University Press Oxford 2002:255-285.
46. Szirmai I, Vastagh I, Szomathelyi E, Kamondi A. Strategic infarcts of the thalamus in vascular dementia. *J Neurol Sci*. 2002;203-204:91-7.

47. Bhatia KP, Marsden CD. The behavioural and motor consequences of focal lesion of the basal ganglia in man. *Brain*. 1994;117:859-76.
48. Chabriat H, Bousser MG. Cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy. In: Bogousslavsky J (ed) *Subcortical stroke*, 2nd edn. Oxford University Press, Oxford 2002:116-26.
49. Tatemichi TK, Desmond DW, Prohovnik I, Cross DT, Gropen TI, Mohr JP, Stern Y. Confusion and memory loss from capsular genu infarction: a thalamocortical disconnection syndrome? *Neurology*. 1992;42:1966-79.
50. Tatemichi TK, Desmond DW, Prohovnik I. Strategic infarcts in vascular dementia. A clinical and brain imaging experience. *Arzeimittelforschung*. 1995;45:371-85.
51. Ollson Y, Brun A, Englund E. Fundamental pathological lesions in vascular dementia. *Acta Neurol Scand*. 1996;168:31-38.
52. Du AT, Schuff N, Laakso MP, Zhu XP, Jagust WJ, Yaffe K, et al. Effects of subcortical ischaemic vascular dementia and AD on entorhinal cortex and hippocampus. *Neurology*. 2002;58:1635-41.
53. Pohjasvaara T, Mantyla R, Salonen O, Aronen HJ, Ylikoski R, Hicanten M, et al. How complex interactions of ischaemic brain infarcts, white matter lesions, and atrophy relate to poststroke dementia. *Arch Neurol*. 2000;57:1295-1300.
54. Esiri MM, Wilcock GK, Morris JH. Neuropathological assessment of the lesions of significance in vascular dementia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1997;63:749-53.
55. Jellinger KA. The pathology of ischemic-vascular dementia: an update. *J Neurol Sci*. 2002;203-204:153-7.
56. Zekry D, Duyckaerts C, Belmin J, Geoffre C, Herman F, Moulias R, et al. The vascular lesions in vascular and mixed dementia: the weight of functional neuroanatomy. *Neurobiol Aging*. 2003;24:213-9.
57. De Freitas GR, Bogousslavsky J. Thalamic infarcts. In: Bogousslavsky J, editor. *Subcortical Stroke*. 2nd ed. Oxford: Oxford University Press. 2002:255-85.
58. Del Ser T, Bermejo F, Portera A, Arredondo JM, Bouras C, Constantinidis J. Vascular dementia. A clinicopathological study. *J Neurol Sci*. 1990;96:1-17.
59. Zarow C, Vinters HV, Ellis WG, Weiner MW, Mungas D, White L, et al. Correlates of hippocampal neuron number in Alzheimer's disease and ischemic vascular dementia. *Ann Neurol*. 2005;57:896-903.
60. Regan C, Katona C, Walker Z, Hooper J, Donovan J, Livingston G. Relationship of vascular risk to the progression of Alzheimer disease. *Neurology*. 2006;67:1357-62.
61. Wen HM, Mok VC, Fay YH, Lam WW, Tang WK, Wong A, et al. Effect of white matter changes on cognitive impairments in patients with lacunar stroke. *Stroke*. 2004;35:1826-30.
62. Caplan LR, Helgason CM. Caudate infarcts. In: Bogousslavsky J, editor. *Lacunar and Other Subcortical Infarctions*. Oxford: Oxford University Press; 1995:117-30.

63. Roman GC. Brain hypoperfusion: a critical factor in vascular dementia. *Neurol Res.* 2004;26:454-8.
64. Zekry D, Duyckaerts C, Belmin J, Geoffre C, Moulias R, Hauw JJ. Microvascular changes induced by cerebral amyloid angiopathy in the elderly: relationship with dementia. *Acta Neuropathol.* 2003;106:367-73.
65. Selden NR, Gitelman DR, Salamon-Mrayama N, Parrish TB, Mesulam MM. Trajectories of cholinergic pathways within the cerebral hemisphere of the human brain. *Brain.* 1998;121:2249-57.
66. Swartz RH, Sahlas DJ, Black SE. Strategic involvement of cholinergic pathways and executive dysfunction: does location of white matter signal hyperintensities matter? *J Stroke Cerebrovasc Dis.* 2003;12:29-36.
67. Tomimoto H, Othani R, Shibata M, Nakamura N, Ihara M. Loss of cholinergic pathways in vascular dementia of the Binswanger type. *Dement Geriatr Cogn Disord.* 2005;19:282-8.
68. Hamel E. Cholinergic modulation of the cortical microvascular bed. *Prog Brain Res.* 2004;145:171-8.
69. Sato A, Sato Y, Uchida S. Regulation of regional cerebral blood flow by cholinergic fibers originating in the basal forebrain. *Int J Dev Neurosci.* 2001;36:190-3.
70. Sato A, Uchida S. Activation of the intracerebral cholinergic nerve fibers originating in the basal forebrain increases regional cerebral blood flow in the rat's cortex and hippocampus. *Neurosci Lett.* 2004;361:90-3.
71. Sakurada T, Alufzoff I, Winblad B, Nordberg A. Substance P-like immunoreactivity, choline acetyltransferase activity and cholinergic muscarinic receptors in Alzheimer's disease and multi-infarct dementia. *Brain Res.* 1990;521:329-32.
72. Martin-Ruiz C, Court J, Lee M, Piggott M, Johnson M, Ballard C, et al. Nicotinic receptors in dementia of Alzheimer, Lewy body and vascular types. *Acta Neurol Scand Suppl.* 2000;176:34-41.
73. Mann DM, Yates PO, Marcyniuk B. The nucleus basalis of Meynert in multi-infarct (vascular) dementia. *Acta Neuropathol.* 1986;71:332-7.
74. Kimura S, Saito H, Minami M, Togashi H, Nakamura N, Nemoto M, et al. Pathogenesis of vascular dementia in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Toxicology.* 2000;153:167-78.
75. Roman GC, Kalaria RN. Vascular determinants of cholinergic deficits in Alzheimer's disease and vascular dementia. *Neurobiol Aging.* 2006;27:1769-85.
76. Perry E, Ziabreva I, Perry R, Aarsland D, Ballard C. Absence of cholinergic deficits in "pure" vascular dementia. *Neurology.* 2005;64:132-3.
77. Keeverne JS, Low WC, Ziabreva I, Court JA, Oakley AE, Kalaria RN. Cholinergic Neuronal Deficit in CADASIL. *Stroke.* 2007;38:188-91.
78. Zhan SS, Beyreuther K, Schmitt HP. Synaptophysin immunoreactivity of the cortical neuropil in vascular dementia of Binswanger type compared with dementia of Alzheimer type and nondemented controls. *Dementia.* 1994;5:79-87.

79. Ishunina TA, Kamphorst W, Swaab DF. Metabolic alterations in the hypothalamus and basal forebrain in vascular dementia. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2004;63:1243-54.
80. Fenelon G, Gray F, Wallays C, Poirier J, Gillard A. Parkinsonism and dilatation of perivascular spaces (état criblé) of the striatum: a clinical, magnetic resonance imaging, and pathological study. *Mov Disord.* 1995;10:754-60.
81. Zijlman JC, Daniel SE, Hughes AJ, Revesz T, Lees AJ. Clinicopathological investigation of vascular parkinsonism, including clinical criteria for diagnosis. *Mov Disord.* 2004;19:630-40.
82. Mark MH, Sage JI, Walters AS, Duvoisin RC, Miller DC. Binswanger's disease presentig as levodopa-responsive parkinsonism: clinicopathologic study of three cases. *Mov Disord.* 1995;10:450-4.
83. Sibon I, Tison F. Vascular parkinsonism. *Curr Opin Neurol.* 2004;17:49-54.
84. Jellinger KA. Vascular parkinsonism. *Therapy.* 2008;5:237-55.
85. Murray ME, Knopman DS, Dickson DW. Vascular dementia: current concepts and clinical developments. *Panminerva Med.* 2007;49:197-207.
86. Alafuzoff I, Gelpi E, Al-Sarray S, Arzberger T, Attems J, Bodi I, et al. The need to unify neuropathological assessments of vascular alterations in the ageing brain: multicentre survey by the BrainNet Europe consortium. *Exp Gerontol* 2012;45:825-33.
87. Jellinger KA, Attems J. Neuropathology and general autopsy findings in nondemented aged subjects. *Clin Neuropathol.* 2012;31:87-98.
88. Jellinger KA. Challenges in the neuropathological diagnosis of dementia. *Int J Neuropathol.* 2013;1:8-52.
89. Kalara RN, Kenny RA, Ballard CG, Perry R, Ince P, Polvikoski T. Towards defining the neuropathological substrates of vascular dementia. *J Neurol Sci.* 2004;226:75-80.
90. Deramecourt V, Slade JY, Oakley AE, Perry RH, Ince PG, Maurage CA, et al. Staging and natural history of cerebrovascular pathology in dementia. *Neurology.* 2012;78:1043-50.
91. Jellinger KA. The enigma of vascular cognitive disorder and vascular dementia. *Acta Neuropathol.* 2007;113:349-88.
92. Ferrer I. Cognitive impairment of vascular origin: neuropathology of cognitive impairment of vascular origin. *J Neurol Sci.* 2010;299:139-49.
93. Markesbery WR. Vascular dementia. In: Markesbery W (ed) *Neuropathology of dementing disorders.* Arnold Publishers. London 1998:293-311.
94. Mikol J. Vascular dementia. In: Duckett S, De La Torre JC (eds). *Pathology of the aging human nervous system, 2nd edn.* Oxford University Press, Oxford. 2001:101-21.
95. Revesz T, Ghiso J, Lashley T, Plant G, Rostagno A, Frangione B, Holton JL. Cerebral amyloid angiopathies: a pathologic, biochemical and genetic view. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2003;62:885-98.
96. Revesz T, Ghiso J, Plant G, Holton JL, Frangione B. Inherited amyloidosis and neurodegenerations in Familial British and Danish Dementia. In: Dickson DW

- (ed) Neurodegeneration. The molecular pathology of dementia and movement disorders. ISN Neuropath Press Basel 2003:380-385.
97. Revesz T, Ghiso J, Plant G, Lashley T, Rostagno A, Frangione B, Holton JL. Cerebral amyloid angiopathy. In: Kalimo H (ed) Pathology and genetics. Cerebrovascular disease. ISN Neuropath Press Basel. 2005:94-102.
 98. Kalimo H, Kalara RN. Hereditary forms of vascular dementia. In: Kalimo H (ed) Pathology and genetics. Cerebrovascular disease. ISN Neuropath Press Basel. 2005:324-34.
 99. Attems J. Sporadic cerebral amyloid angiopathy: pathology, clinical implications and possible pathomechanisms. *Acta Neuropathol.* 2005;110:345-59.
 100. Revesz T, Holton JL, Lashley T, Plant G, Rostagno A, Ghiso J, Frangione B. Sporadic and familial cerebral amyloid angiopathies. *Brain Pathol.* 2002;12:343-57.
 101. Wisniewski HM, Frackowiak J, Zoltowska A, Kim KS. Vascular beta amyloid in Alzheimer's disease angiopathy is produced by proliferating and degenerating smooth muscle cells. *Int J Exp Clin Invest.* 1994:8-16.
 102. Herzig MC, Winkler DT, Burgmeister P, Pfeifer M, Kohler E, Schmidt SD, et al. A β is targeted to the vasculature in a mouse model of hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis. *Nat Neurosci.* 2004;7:954-60.
 103. Weller RO, Kida S, Zhang ET. Pathway of fluid drainage from the brain – morphological aspects and immunological significance in rat and man. *Brain Pathol.* 1992;2:277-84.
 104. Weller RO, Masscy An, Newman TA, Hutchings M, Kuo YM, Roher AE. Cerebral amyloid angiopathy: amyloid beta accumulates in putative interstitial fluid drainage pathways in Alzheimer's disease. *Am J Pathol.* 1998;153:725-33.
 105. Vinters HV, Farag ES. Amyloidosis of cerebral arteries. In: Meldrum H (ed) Ischemic stroke. *Advances in Neurology*, vol 92. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia. 2003:105.
 106. Ishii N, Nishihara Y, Horie A. Amyloid angiopathy and lobar cerebral hemorrhage. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1984;47:1203-10.
 107. Itoh Y, Yamada M, Hayakawa M, Otomo E, Miyatake T. Cerebral amyloid angiopathy: a significant cause of cerebellar as well as lobar cerebral hemorrhage in the elderly. *J Neurol Sci.* 1993;116:135-41.
 108. Vinters HV, Gilbert JJ. Cerebral amyloid angiopathy: incidence and complications in the aging brain. II. The distribution of amyloid vascular changes. *Stroke.* 1983;14:924-8.
 109. Jellinger KA. Alzheimer disease and cerebrovascular pathology: an update. *J Neural Transm.* 2002;109:813-36.
 110. Vonsattel JP, Meyer RH, Hedley-Whyte ET, Ropper AH, Bird ED, Richardson Jr EP. Cerebral amyloid angiopathy without and with cerebral hemorrhages: a comparative histological study. *Ann Neurol.* 1991;30:637-49.
 111. Hill MD, Silver FL, Austin PC, Tu JV. Rate of stroke recurrence in patients with primary intracerebral hemorrhage. *Stroke.* 2000;31:123-7.

112. Nakada-Kudo Y, Mizuno T, Yamada K, Shiga K, Yoshikawa K, Moris S, i sur. Microbleeds in Alzheimer disease are more related to cerebral amyloid angiopathy than cerebrovascular disease. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 2006;22:8-14.
113. Cullen KM, Kocszi Z, Stone J. Microvascular pathology in the aging human brain: evidence that senile plaques are sites of microhemorrhages. *Neurobiol Aging*. 2006;27:1786-96.
114. Cadavid D, Mena H, Koeller K, Frommelt RA. Cerebral beta amyloid angiopathy is a risk factor for cerebral ischemic infarction. A case control study in human brain biopsies. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2000;59:768-73.
115. Olichney JM, Ellis RJ, Katzman R, Sabbagh MN, Hansen L. Types of cerebrovascular lesions associated with severe cerebral amyloid angiopathy in Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci*. 1997;826:493-7.
116. Olichney JM, Hansen LA, Hofstetter CR, Lee JH, Katzman R, Thal LJ. Association between severe cerebral amyloid angiopathy and cerebrovascular lesions in Alzheimer disease is not a spurious and attributable to apolipoprotein E epsilon 4. *Arch Neurol*. 2000;57:869-74.
117. Tabaton M, Caponnetto C, Mancardi G, Loeb C. Amyloid beta protein deposition in brains from elderly subjects with leukoaraiosis. *J Neurol Sci*. 1991;106:123-7.
118. Tomimoto H, Akiguchi I, Akiyama H, Ikeda K, Wakita H, Lin JX, Budka H. Vascular changes in white matter lesions of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol*. 1999;97:629-34.
119. Chen JW, Gurol ME, Rosand J, Viswanathan A, Rakich SM, Groover TR, i sur. Progression of white matter lesions and hemorrhages in cerebral amyloid angiopathy. *Neurology*. 2006;67:83-7.
120. Jellinger KA, Attems J. Prevalence and pathogenic role of cerebrovascular lesion in Alzheimer disease. *J Neurol Sci*. 2005;229-230:37-41.
121. Pfeifer LA, White LR, Ross GW, Petrovitch H, Launer LJ. Cerebral amyloid angiopathy and cognitive function: The HAAS autopsy study. *Neurology*. 2002;58:1629-34.
122. Grabowski TI, Cho HS, Vonsattel JP, Rebeck GW, Greenberg SM: Novel amyloid precursor protein mutations in a Iowa family with dementia and severe cerebral amyloid angiopathy. *Ann Neurol*, 2001;49:697-705.
123. Nilsberth C, Westlind-Danielsson A, Eckman CB, Condron MM, Axelman K, Forsell C, i sur. The Arctic APP mutations (E693G) causes Alzheimer's disease by enhanced Abeta protofibril formation. *Nat Neurosci*. 2001;4:887-93.
124. Wattendorff AR, Frangione B, Luyendijk W, Bots GT: Hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis Dutch type (HCHWA-D) clinicopathological studies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1995;58:699-705.
125. Plant G, Ghiso J, Holton JL, Frangione B, Revesz T: Familial and sporadic cerebral amyloid angiopathies associated with dementia and the B1 dementia. In: Esiri MM, Lee VMY, Trojanowski JO (eds). *The neuropathology of dementia*. Cambridge University Press, Cambridge. 2004:330-52.

126. Holton JL, Lashely T, Ghiso J, Braendgaard H, Vidal R, Guerin CJ, i sur. Familial Danish dementia: a novel form of cerebral amyloidosis associated with deposition of both amyloid Dan and amyloid beta. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2002;61:254-67.
127. Klung WE, Engler H, Nordberg A, Wan Y, Blomqvist G, Holt DP, i sur. Imaging brain amyloid in Alzheimer's disease with Pittsburgh Compound B. *Ann Neurol.* 2004;55:306-19.
128. Knudsen KA, Rosand J, Karluk D, Greenberg SM. Clinical diagnosis of cerebral amyloid angiopathy: validation of the Boston Criteria. *Neurology.* 2001;56:537-9.
129. Benson MD. Leptomeningal amyloid and variant transthyretins. *Am J Pathol.* 1982;148:351-4.
130. Blevins G, Macaulay R, Harder S, Fladeland D, Yamashita T, Yazaki M, i sur. Oculoleptomeningeal amyloidosis in a large kindred with a new transthyretin variant Tyr69His. *Neurology.* 2003;60:1625-30.
131. Yoosry TA, Seelos K, Mayer M, Bruning R, Uttner I, Cichgans M, i sur. Characteristic MR lesion pattern and correlation on T1 and T2 lesion volume with neurologic and neuropsychological findings in cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy (CADASIL). *AJNR Am J Neuroradiol.* 1999;20:90-1.
132. Kalimo H, Ruchoux MM, Viitanen M, Kalaria RN. CADASIL: a common form of hereditary arteriopathy causing brain infarcts and dementia. *Brain Pathol.* 2002;12:371-84.
133. Mesulam M, Siddique T, Cohen B. Cholinergic denervation in pure multiinfarct state: observations on CADASIL. *Neurology.* 2003;1183-5.
134. Kaverne JS, Low WC, Ziabreva I, Court JA, Oakley AE, Kalaria RN. Cholinergic neuronal deficits in CADASIL. *Stroke.* 2007;38:188-91.
135. Ophoff RA, DeYoung J, Service SK, Joosse M, Cafo NA, Sandkuij LLA, i sur. Hereditary vascular retinopathy, cerebroretinal vasculopathy and hereditary endotheliopathy with retinopathy, nephropathy and stroke map to a single locus on chromosome 3p21.1-p21.3. *Am J Hum Genet.* 2001;69:447-53.
136. Powers JM, DeVivo DC. Peroxisomal and mitochondrial disorders. In Lantos P (ed) *Greenfield's neuropathology*, 7th edn. Arnold Publishing, London, pp 737-797.
137. Muller-Hocker J, Hubner G, Bise K, Forster C, Hauck S, Paetzke I, i sur. Generalized mitochondrial microangiopathy and vascular cytochrome c oxidase deficiency. Occurrence in a case of MELAS syndrome with mitochondrial cardiomyopathy-myopathy and combined complex I/IV deficiency. *Arch Pathol Lab Med.* 1993;117:202-10.
138. Roman GC, Tatenichi TK, Erkinjuntti T, Cummings JL, Masdeu JC, Garcia JH, i sur. Vascular dementia: diagnostic criteria for research studies. Report of the NINDS-AIREN International Workshop. *Neurology.* 1993;43:250-60.

139. Roman GC, Royall DR. Executive control function: a rational basis for the diagnosis of vascular dementia. *Alzheimer Dis Assoc Disord.* 1999;13(3):69-80.
140. Royal DR, Mulroy AR, Chiodo LK, Polk MJ. Clock drawing is sensitive to executive control: a comparison of six methods. *J Gerontol B Psychol Sci Soc Sci.* 1999;54:328-33.
141. Reitan RM, Davidson LA. *Clinical neuropsychology : current status and applications.* Washington. DC: Hemisphere; 1974.
142. Mungas D, Jagust WJ, Reed BR, Kramer JH, Weiner MW, Schuff N, i sur. MRI predictors of cognition in subcortical ischemic vascular disease an Alzheimer's disease. *Neurology,* 2001;57:2229-35.
143. Vinters HV, Ellis WG, Zarow C, Zaias BW, Jagust WJ, Mack WJ, Chui HC. Neuropathologic substrate of ischemic vascular dementia. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2000;59:931-45.
144. Chui H. Vascular dementia, a new beginig. Shifting focus from clinical phenotype to ischemic brain injury. *Neurol Clin.* 2000,18:951-77.
145. Moroney JT, Bagiella E, Desmond DW, Hachinski VC, Mölsä PK, Gustafson L, i sur. Meta analysis of the Hachinski ischemic score in pathologically verified dementias. *Neurology* 1997;49:1096-105.
146. Carotenuto A, Rea R, Colucci L, Ziello AR, Molino I, Carpi S, i sur. Late and early onset dementia: what is the role of vascular factors? A retrospective study. *J Neurol Sci.* 2012, 322:170–5.
147. Corrada MM, Berlau DJ, Kawas CH. A population-based clinicopathological study in the oldest-old: the 90+ study. *Curr Alzheimer Res.* 2012, 9:709–17.
148. Roman GC, Kalaria RN. Vascular determinants of cholinergic deficits in Alzheimer disease and vascular dementia. *Neurobiol Aging.* 2006,27:1769–85.
149. Jellinger KA, Attems J: Neuropathological evaluation of mixed dementia. *J Neurol Sci.* 2007; 257:80–7.
150. Kalaria RN, Ballard C. Overlap between pathology of Alzheimer disease and vascular dementia. *Alzheimer Dis Assoc Disord.*1999;13:115–23.
151. Braak E, Griffing K, Arai K, Bohl J, Bratzke H, Braak H. Neuropathology of Alzheimer's disease: what is new since A. Alzheimer? *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci.* 1999;249(3):14–22.
152. Ezekiel F, Chao L, Kornak J, Du AT, Cardenas V, Truran D, i sur.. Comparisons between global and focal brain atrophy rates in normal aging and Alzheimer disease: Boundary Shift Integral versus tracing of the entorhinal cortex and hippocampus. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 2004.18:196-201.
153. De Leon MJ, Mcrae T, Tsai JR, George AE, Marcus DL, Freedman M, Wolf AP, Mcewen B. Abnormal cortisol response in Alzheimer's disease linked to hippocampal atrophy. *Lancet.* 1988;332:391–2.
154. Seab JP, Jagust WS, Wong SFS, Roos MS, Reed BR, Budinger TF. Quantitative NMR measurements of hippocampal atrophy in Alzheimer's disease. *Magn Reson Med.* 1988;8:200–8.

155. Jagust W. Positron emission tomography and magnetic resonance imaging in the diagnosis and prediction of dementia. *Alzheimers Dementia*. 2006;2:36–42.
156. Laakso MP, Partanen K, Riekkinen P, Lehtovirta M, Helkala EL, Hallikainen M, i sur. Hippocampal volumes in Alzheimer's disease, Parkinson's disease with and without dementia, and in vascular dementia: an MRI study. *Neurology*. 1996;46:678–81.
157. Frisoni GB, Laakso MP, Beltramello A, Geroldi C, Bianchetti A, Soininen H, Trabucchi M. Hippocampal and entorhinal cortex atrophy in frontotemporal dementia and Alzheimer's disease. *Neurology*. 1999;52:91–100.
158. Scheltens P, Leys D, Barkhof F, Huglo D, Weinstein HC, Vermersch P, i sur. Atrophy of medial temporal lobes on MRI in "probable" Alzheimer's disease and normal ageing: diagnostic value and neuropsychological correlates. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1992;55:967-72.
159. Scheltens P, Barkhof F, Leys D, Pruvo JP, Nauta JJ, Vermersch P, i sur. Semiquantitative rating scale for the assessment of signal hyperintensities on magnetic resonance imaging. *J Neurol Sci*. 1993;114:7-12.
160. Chen W, Song X, Zhang Y, Darvesh S, Zhang N, D'Arcy RC, i sur. An MRI based semiquantitative index for the evaluation of brain atrophy and lesions in Alzheimer's disease, mild cognitive impairment and normal aging. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 2010;30:121–30.
161. Zhang N, Song X, Zhang Y, Chen W, D'Arcy RC, Darvesh S, i sur. Alzheimer's disease Neuroimaging Initiative: An MRI brain atrophy and lesion index to assess the progression of structural changes in Alzheimer's disease, mild cognitive impairment, and normal aging: A follow-up study. *J Alzheimers Dis*. 2011;26(3):359–67.
162. Knopman DS, DeKosky ST, Cummings JL, Chui H, Corey–Bloom J, Relkin N, i sur. Practice parameter: diagnosis of dementia (an evidence-based review). Report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology* 2001;56:1143–53.
163. Braak H, Braak E, Ohm T, Bohl J. Alzheimer's disease: mismatch between amyloid plaques and neuritis plaques. *Neurosci Lett*. 1989;103:24-8.
164. Castano EM, Frangio B. Biology of disease. Human amyloidosis, Alzheimer's disease and related disorders. *Lab Invest* 1988;68:122-32.
165. Davies L, Wolska B, Hilbich C, Multhaup G, Marins R, Simms G, i sur. A4 amyloid protein deposition and the diagnosis of Alzheimer's disease: prevalence in aged brains determined by immunocytochemistry compared with conventional neuropathologic techniques. *Neurology*. 1988;38:1688-93.
166. Mann DMA, Jones D, Prinja D, Purkiss MS. The prevalence of amyloid (A4) protein deposits within the cerebral and cerebellar cortex in Down's syndrome and Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol*. 1990;80:318-27.
167. Ogomori K, Ktamoto T, Tateishi J, Sato Y, Suetsugu M, Abe M. β Protein amyloid is widely distributed in the central nervous system of patients with Alzheimer's disease. *Am J Pathol*. 1989;134:243-51.

168. Yamaguchi H, Hirai S, Morimatsu M, Shoji M, Thara Y. A variety of cerebral amyloid deposits in the brains of the Alzheimer-type dementia demonstrated by β protein immunostaining. *Acta Neuropathol.* 1989;76:541-9.
169. Braak H, Braak E. Morphology of the human isocortex in young and aged individuals: qualitative and quantitative findings. *Interdiscip Top Gerontol.* 1988;25:1-15.
170. Braak H, Braak E. Morphology of the cerebral cortex in relation to Alzheimer's dementia. In: Maurer K, Riederer P, Beckmann H (eds) *Alzheimer's disease. Epidemiology, Neuropathology, Neurochemistry and Clinics. Key Topics in Brain research.* Springer Wien. 1990:85-91.
171. Mann DMA. The neuropathology of Alzheimer's disease: a review with pathogenetic, aetiological and therapeutic considerations. *Mech Ageing Dev.* 1985;31:213-55.
172. Terry RD. Alzheimer's disease. In: Davis RL, Robertson DM (eds) *Textbook of neuropathology.* Williams and Wilkins, Baltimore 1985:824-41.
173. Tomlinson BE. The neuropathology of Alzheimer's disease – Issues in need of resolution. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 1989;15:491-512.
174. Tomlinson BE, Corsellis JAN. Ageing and the dementias. In Adam JL, Corsellis JAN, Duchon LW (eds) *Greenfield's neuropathology.* Arnold, London 1984:951-1025.
175. Yamaguchi H, Nakazato Y, Shoji M, Ihara Y, Hirai S. Ultrastructure of neuropil threads in the Alzheimer brain: their dendritic origin and accumulation in the senile plaques. *Acta Neuropathol.* 1990;80:368-74.
176. Šimić G. Neurobiologija demencija. In: *Biološke osnove i terapija ponašanja. Školska knjiga Zagreb* 2006:187-211.
177. Braak H, Braak E. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol.* 1991;82(4):239-59.
178. Braak H, Braak E, Bohl J. Staging of Alzheimer-related cortical destruction. *Eur Neurol.* 1993;33(6): 403-8.
179. Haass C, Schlossmacher MG, Hung AY, Vigo-Pelfrey C, Mellon A, Ostaszewski BL i sur. Amyloid beta-peptide is produced by cultured cells during normal metabolism. *Nature* 1992;359:322–5.
180. O'Brien RJ, Wong PC. Amyloid Precursor Protein Processing and Alzheimer's Disease. *Annu Rev Neurosci.* 2011;34:185–204.
181. Bergmans BA, De Strooper B. Gamma-secretases: from cell biology to therapeutic strategies. *Lancet Neurol.* 2010;9:215–26.
182. Avramopoulos D. Genetics of Alzheimer's disease: recent advances. *Genome Med.* 2009;1:34.1–34.7.
183. Butterfield DA. Amyloid β -peptide (1–42)-induced oxidative stress and neurotoxicity: implications for neurodegeneration in Alzheimer's disease brain. A review. *Free Radic Res.* 2002;36:1307–13.
184. Gentleman SM, Greenberg BD, Savage MJ, Noori M, Newman SJ, Roberts GW, i sur. A β 42 is the predominant form of amyloid beta-protein in the brains of short-term survivors of head injury. *Neuroreport* 1997;8:1519–22.

185. Gunnar KG, Tsai J, Naslund J, Vincent B, Edgar M, Checler F, i sur. Intran neuronal A β 42 accumulation in human brain. *Am J Pathol* 2000;156:15–20.
186. Holsinger RM, McLean CA, Beyreuther K, Masters CL, Evin G. Increased expression of the amyloid precursor β -secretase in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 2002;51:783–86.
187. Kamenetz F, Tomita T, Hsieh H, Seabrook G, Borchelt D, Iwatsubo T, i sur. APP processing and synaptic function. *Neuron* 2003;37:925–37.
188. Mawuenyega KG, Sigurdson W, Ovod V, Munsell L, Kasten T, Morris JC, i sur. Decreased clearance of CNS β -amyloid in Alzheimer's disease. *Science*. 2010;330:17.
189. Hardy J, Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science*. 2002;297:353–6.
190. Rovelet-Lecrux A, Hannequin D, Raux G, Le Meur N, Laquerrière A, Vital A, i sur. APP locus duplication causes autosomal dominant early-onset Alzheimer disease with cerebral amyloid angiopathy. *Nat Genet*. 2006;38:24–6.
191. Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, i sur. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science*. 1993;261(5123):921-3.
192. Walsh DM, Selkoe DJ. Deciphering the molecular basis of memory failure in Alzheimer's disease. *Neuron*. 2004;44:181–93.
193. Farkas E, Luiten PG. Cerebral microvascular pathology in aging and Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol*. 2001;64:575–611.
194. Blennow K. Alzheimer's disease. Seminar. *Lancet*. 2006;368:387-403.
195. Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Tung YC, Quinlan M, Wisniewski HM, Binder LI. Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein τ (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc Natl Acad Sci* .1986;83:4913–17.
196. Nukina N, Ihara Y. One of the antigenic determinants of paired helical filaments is related to tau protein. *J Biochem*. 1986;99:1541–4.
197. Iqbal K, Alonso Adel C, Chen S, Chohan MO, El-Akkad E, Gong CX, i sur. Tau pathology in Alzheimer disease and other tauopathies. *Biochim Biophys Acta*. 2005;1739:198–210.
198. Braak E, Griffin K, Arai K, Bohl J, Bratzke H, Braak H. Neuropathology of Alzheimer's disease: what is new since A. Alzheimer? *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*. 1999;249(3):14–22.
199. Goedert M, Spillantini MG, Jakes R, Rutherford D, Crowther RA. Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease, *Neuron*. 1989;3:519–26.
200. Neve LR, Harris P, Kosik KS, Kurnit DM, Donlon TA. Identification of cDNA clones for the human microtubule-associated protein tau and chromosomal localization of the genes for tau and microtubule-associated protein 2. *Brain Research*.1986;387(3):271–80.

201. Kopke E, Tung YC, Shaikh S, del Alonso C, Iqbal K, Grundke-Iqbal I. Microtubule associated protein tau: abnormal phosphorylation of a non-paired helical filament pool in Alzheimer disease, *J Biol Chem*. 1993;268:24374–84.
202. Buee L, Bussiere T, Buee-Scherrer V, Delacourte A, Hof PR. Tau isoforms in neurodegenerative disorders. *Brain Res Rev*. 2000;33:95–130.
203. Lee VM, Goedert M, Trojanowski JQ. Neurodegenerative tauopathies. *Annu Rev Neurosci*. 2000;24:1121–59.
204. Sergeant N, Delacourte A. and Buee L. Tau protein as a differential biomarker of tauopathies. *Biochim Biophys Acta*. 2005;1739:179–97.
205. Sergeant N, Bretteville A, Hamdane M, Caillet-Boudin ML, Grognet P, Bombois S, i sur. Biochemistry of Tau in Alzheimer's disease and related neurological disorders. *Expert Rev Proteomics*. 2008;5:207–24.
206. Hasegawa M, Morishima-Kawashima M, Takio K, Suzuki M, Titani K, Ihara Y. Protein sequence and mass spectrometric analyses of tau in the Alzheimer's disease brain. *J Biol Chem*. 1992; 267:17047–54.
207. Lovestone S, Reynolds CH. The phosphorylation of tau: a critical stage in neurodevelopment and neurodegenerative processes. *Neuroscience*. 1997;78:309–24.
208. Morishima-Kawashima M, Hasegawa M, Takio K, Suzuki M, Yoshida H, Titani K, Ihara Y. Proline-directed and non-proline-directed phosphorylation of PHF-tau. *J Biol Chem* 1995;270:823–9.
209. Paudel HK, Li W. Heparin-induced conformational change in microtubule-associated protein Tau as detected by chemical cross-linking and phosphopeptide mapping. *J Biol Chem*. 1999;274:8029–38.
210. Roder HM, Fracasso RP, Hoffman FJ, Witowsky JA, Davis G, Pellegrino CB. Phosphorylation-dependent monoclonal tau antibodies do not reliably report phosphorylation by extracellular signal-regulated kinase 2 at specific sites. *J Biol Chem*. 1997;272:4509–15.
211. Drewes G, Lichtenberg-Kraag B, Doring F, Mandelkow EM, Biernat J, Goris J, Doree M, Mandelkow E. Mitogen activated protein (MAP) kinase transforms tau protein into an Alzheimer-like state. *EMBO J*. 1992;11:2131–8.
212. Goedert M, Hasegawa M, Jakes R, Lawler S, Cuenda A, Cohen P. Phosphorylation of microtubule-associated protein tau by stress-activated protein kinases. *FEBS Lett*. 1997;409:57–62.
213. Hanger DP, Hughes K, Woodgett JR, Brion JP, Anderton BH. Glycogen synthase kinase-3 induces Alzheimer's disease-like phosphorylation of tau: generation of paired helical filament epitopes and neuronal localisation of the kinase. *Neurosci Lett*. 1992;147:58–62.
214. Takahashi M, Tomizawa K, Ishiguro K, Takamatsu M, Fujita SC, Imahori K. Involvement of tau protein kinase I in paired helical filament-like phosphorylation of the juvenile tau in rat brain. *J Neurochem*. 1995;64:1759–68.

215. Baumann K, Mandelkow EM, Biernat J, Piwnica-Worms H, Mandelkow E. Abnormal Alzheimer-like phosphorylation of tau pro-te-in by cyclin-dependent kinases cdk2 and cdk5. *FEBS Lett.*1993;336:417–24.
216. Liu WK, Williams RT, Hall FL, Dickson DW, Yen SH. Detection of a Cdc2-related kinase associated with Alzheimer paired helical filaments. *Am J Pathol.*1995;146:228–38.
217. Goedert M, Hasegawa M, Jakes R, Lawler S, Cuenda A, Cohen P. Phosphorylation of microtubule-associated protein tau by stress-activated protein kinases. *FEBS Lett.* 1997;409:57–62.
218. Jenkins SM, Zinnerman M, Garner C, Johnson GV. Modulation of tau phosphorylation and intracellular localization by cellular stress. *Biochem J.* 2000;345:263–70.
219. Reynolds CH, Utton MA, Gibb GM, Yates A, Anderton BH. Stress-activated protein kinase/c-jun N-terminal kinase phosphorylates tau protein. *J Neurochem.*1997;68:1736–44.
220. Drewes G, Ebner A, Preuss U, Mandelkow EM, Mandelkow E. MARK, a novel family of protein kinases that phosphorylate microtubule-associated proteins and trigger microtubule disruption. *Cell.*1997;89:297–308.
221. Baudier J, Cole RD. Phosphorylation of tau proteins to a state like that in Alzheimer's brain is catalyzed by a calcium/calmodulin-dependent kinase and modulated by phospholipids. *J Biol Chem.*1987;262:17577–83.
222. Johnson GV. Differential phosphorylation of tau by cyclic AMP-21 dependent protein kinase and Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II: metabolic and functional consequences. *J Neurochem.*1992;59:2056–62.
223. Jicha GA, O'Donnell A, Weaver C, Angeletti R, Davies P. Hierarchical phosphorylation of recombinant tau by the paired-helical filament-associated protein kinase is dependent on cyclic AMP-dependent protein kinase. *J Neurochem.*1999;72:214–24.
224. Greenwood JA, Scott CW, Spreen RC, Caputo CB, Johnson GV. Casein kinase II preferentially phosphorylates human tau isoforms containing an amino-terminal insert. Identification of threonine 39 as the primary phosphate acceptor. *J Biol Chem.*1994;269: 4373–80.
225. Buee-Scherrer V, Condamines O, Mourton-Gilles C, Jakes R, Goedert M, Pau B, Delacourte A. AD2, a phosphorylation-dependent monoclonal antibody directed against tau proteins found in Alzheimer's disease. *Mol Brain Res.*1996;39:79–88.
226. Garver TD, Harris KA, Lehman RA, Lee VMY, Trojanowski JQ, Billingsley ML. Tau phosphorylation in human, primate, and rat brain: evidence that a pool of tau is highly phosphorylated in vivo and is rapidly dephosphorylated in vitro. *J Neurochem.*1994;63: 2279–82.
227. Matsuo ES, Shin RW, Billingsley ML, Van deVoorde A, O'Connor M, Trojanowski JQ, Lee VMY. Biopsy-derived adult human brain tau is phosphorylated at many of the same sites as Alzheimer's disease paired helical filament tau. *Neuron.*1994;13:989–1002.

228. Soulie C, Lepagnol J, Delacourte A, Caillet-Boudin ML. Dephosphorylation studies of SKNSH-SY 5Y cell Tau proteins by endogenous phosphatase activity. *Neurosci Lett.*1996; 206:189–94.
229. Cohen P, Cohen PT. Protein phosphatases come of age. *J Biol Chem.*1989;264:21435–8.
230. Ingebritsen TS, Cohen P. Protein phosphatases: properties and role in cellular regulation. *Science.* 1983;221:331–8.
231. Dudek SM, Johnson GV. Postnatal changes in serine/threonine protein phosphatases and their association with the microtubules. *Dev Brain Res.*1995;90:54–61.
232. Hisanaga T. In situ dephosphorylation of tau by protein phosphatase 2A and 2B in fetal rat primary cultured neurons. *FEBS Lett.* 1995;376:238–42.
233. Blennow K, Hampel H. CSF markers for incipient Alzheimer's disease. *Lancet Neurol.* 2003;2:605-13.
234. Morikawa Y, Arai H, Matsushita S, et al. Cerebrospinal fluid tau protein levels in demented and nondemented alcoholics. *Alcohol Clin Exp Res.*1999;23:575–7.
235. Sjögren M, Minthon L, Davidsson P, Granérus AK, Clarberg A, Vanderstichele H, i sur. CSF levels of tau, amyloid1-42 and GAP-43 in frontotemporal dementia, other types of dementia and normal aging. *J Neural Transm* 2000; 107: 563-7.
236. Blennow K, Wallin A, Ågren H, Spenger C, Siegfried J, Vanmechelen E. Tau protein in cerebrospinal fluid: a biochemical diagnostic marker for axonal degeneration in Alzheimer's disease? *Mol Chem Neuropathol.* 1995;26:231–45.
237. Andreasen N, Minthon L, Clarberg A, et al. Sensitivity, specificity and stability of CSF t-tau in AD in a community-based patient sample. *Neurology.* 1999;53:1488–94.
238. Munroe WA, Southwick PC, Chang L, et al. Tau protein in cerebrospinal fluid as an aid in the diagnosis of Alzheimer's disease. *Ann Clin Lab Sci.* 1995;25:207–17.
239. Riemenschneider M, Buch K, Schmolke M, Kurz A, Guder WG. Cerebrospinal protein tau is elevated in early Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 1996;212:209–11.
240. Arai H, Terajima M, Miura M, Higuchi S, Muramatsu T, Machida N, i sur. Tau in cerebrospinal fluid: a potential diagnostic marker in Alzheimer's disease. *Ann Neurol.* 1995;38:649–52.
241. Martinez M, Fernandez E, Frank A, Guaza C, de la Fuente M, Hernanz A. Increased cerebrospinal fluid cAMP levels in Alzheimer's disease. *Brain Res.*1999;846:265–7.
242. Hulstaert F, Blennow K, Ivanoiu A, i sur. Improved discrimination of AD patients using betaamyloid(1-42) and tau levels in CSF. *Neurology.*1999;52:1555–621.

243. Shoji M, Matsubara E, Kanai M, i sur. Combination assay of CSF tau, A β 1-40 and A β 1-42(43) as a biochemical marker of Alzheimer's disease. *J Neurol Sci.* 1998;158:134–40.
244. Hulstaert F, Blennow K, Ivanoiu A, i sur. Improved discrimination of AD patients using betaamyloid(1-42) and tau levels in CSF. *Neurology.* 1999;52:1555–62.
245. Jellinger KA. Diagnostic accuracy of Alzheimer's disease: a clinicopathological study. *Acta Neuropathol.*1996;91:219–20.
246. Kosunen O, Soininen H, Paljärvi L, Heinonen O, Talasniemi S, Riekkinen PJ, i sur. Diagnostic accuracy of Alzheimer's disease: a neuropathological study. *Acta Neuropathol.* 1996;91:185–93.
247. Green AJ, Harvey RJ, Thompson EJ, Rossor MN. Increased tau in the cerebrospinal fluid of patients with frontotemporal dementia and Alzheimer's disease. *Neurosci Lett.* 1999;259:133–5.
248. Sjögren M, Davidsson P, Tullberg M, Minthon L, Wallin A, Wikkelso C, i sur. Both total and hyperphosphorylated tau are increased in Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2001;70:624–30.
249. Vanmechelen E, Vanderstichele H, Davidsson P, Van Kerschaver E, Van Der Perre B, Sjögren M, i sur. Quantification of tau phosphorylated at threonine 181 in human cerebrospinal fluid: a sandwich ELISA with a synthetic phosphopeptide for standardization. *Neurosci Lett.* 2000;285:49–52.
250. Iqbal K, Alonso Adel C, Chen S, Chohan MO, El-Akkad E, Gong CX, i sur. Tau pathology in Alzheimer disease and other tauopathies. *Biochim Biophys Acta.* 2005;1739:198–210.
251. Buerger K, Teipel SJ, Zinkowski R, Blennow K, Arai H, Engel R, Hofmann-Kiefer K, McCulloch C, Ptok U, Heun R, Andreasen N, DeBernardis J, Kerkman D, Moeller H, Davies P, Hampel H. CSF tau protein phosphorylated at threonine 231 correlates with cognitive decline in MCI subjects. *Neurology.* 2002a;59:627–9.
252. Buerger K, Ewers M, Pirttila T, Zinkowski R, Alafuzoff I, Teipel SJ, DeBernardis J, Kerkman D, McCulloch C, Soininen H, Hampel H. CSF phosphorylated tau protein correlates with neocortical neurofibrillary pathology in Alzheimer's disease. *Brain.* 2006;129:3035–41.
253. Hampel H, Blennow K, Shaw LM, Hoessler YC, Zetterberg H4, Trojanowski JQ. Total and Phosphorylated Tau Protein as Biological Markers of Alzheimer's Disease. *Exp Gerontol.* 2010 45(1):30-40.
254. Blom ES, Giedraitis V, Zetterberg H, Fukumoto H, Blennow K, Hyman BT, Irizarry MC, Wahlund LO, Lannfelt L, Ingelsson M. Rapid progression from mild cognitive impairment to Alzheimer's disease in subjects with elevated levels of tau in cerebrospinal fluid and the APOE epsilon4/epsilon4 genotype. *Dement Geriatr Cogn Disord.* 2009;27:458–64.
255. Buerger K, Ewers M, Andreasen N, Zinkowski R, Ishiguro K, Vanmechelen E, Teipel SJ, Graz C, Blennow K, Hampel H. Phosphorylated tau predicts rate of

- cognitive decline in MCI subjects: a comparative CSF study. *Neurology*. 2005;65:1502–3.
256. Sämngård K, Zetterberg H, Blennow K, Hansson O, Minthon L, Londos E. Cerebrospinal fluid total tau as a marker of Alzheimer's disease intensity. *Int J Geriatr Psychiatry*. 2010 Apr;25(4):403-10.
 257. Fagan AM, Holtzman DM. Cerebrospinal fluid biomarkers of Alzheimer's disease. *Biomarkers Med* 2010;4(1):51-63.
 258. Blennow K. Cerebrospinal fluid protein biomarkers for Alzheimer's disease. *The American Society for Experimental NeuroTherapeutics Inc*. 2004;1;213-25.
 259. Vandermeeren M, Mercken M, Vanmechelsen E, Six j, van da Voorde A, Martin JJ, i sur. Detection of tau proteins in normal and Alzheimer disease cerebrospinal fluid with a sensitive sandwich enzyme-linked immunosorbent assay. *J Neurochem*. 1993;61:1828-34.
 260. Blennow K, Wallin A, Ägren H, Spenger C, Siegfried J, Vanmechelen E. Tau protein in cerebrospinal fluid: a biochemical diagnostic marker for axonal degeneration in Alzheimer's disease? *Mol Chem Neuropathol*. 1995;26:231-45.
 261. Mori H, Hosoda K, Matsubara E, Nakamoto T, Furiya Y, Endoh R, i sur. Tau in cerebrospinal fluids: establishment of the sandwich ELISA with antibody specific to the repeat sequence in tau. *Neurosci Lett*. 1995;186:181-3.
 262. Blennow K, Vanmechelsen E, Hampel H. CSF t-tau, A β 42 and phosphorylated tau protein as biomarkers for Alzheimer's disease. *Mol Neurobiol*. 2001;24:87-97.
 263. Vandermeeren M, Mercke M, Vanmechelen E, Six J, vad de Voored A, MartinJJ et al. Detection of tau protein in normal and Alzheimer's disease cerebrospinal fluid with a sensitive sandwich enzyme-linked immunosorbent assay. *J Neurochem*.1993;61:1828-34.
 264. Olsson B, Lautner R, Anreasson U. Ohrfelt A, Portelisu E, Bjerke M et al. CSF and blood miomarkers for the diagnosis of Alzheimer's disease: a systematic review and metaanalysis. *Lancet Neurol*. 2016;15(7):673-84.
 265. Hesse C, Rosengren L, Andreasen N, Davidsson P, Vanderstichele H, Vanmechelen E, Blennow K. Transient increase in total tau but not phospho-tau inhuman cerebrospinal fluid after acute stroke. *Neurosci Lett*. 2001;297:187-90.
 266. Otto M, Wiltfang J, Tumani H, Zerr I, Lantsch M, Kornhuber J, i sur. Elevated levels of tau-protein in cerebrospinal fluid of patients with Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurosci Lett*. 1997;225:210-12.
 267. Schonknecht P, Pantel J, Hartmann T, Werle TE, Volkmann M, Essig M, i sur. Cerebrospinal fluid tau levels in Alzheimer's disease are elevated when compared with vascular dementia but do not correlate with measures of cerebral atrophy. *Psychiatry Research*. 2003;120:231–8.
 268. Nagga K, Gottfries J, Blennow K, Marcusson J. Cerebrospinal sluid phosphor-Tau, total Tau and beta-amyloid (1-42) in the differentiation between Alzheimer's disease and vascular dementia. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 2002;14:183-90.

269. Schönknecht P, Pantel J, Hunt A, Volkmann M, Buerger K, Hampel H, Schröder J. Levels of total tau protein phosphorylated at threonine 181 in patient with incipient and manifest Alzheimer's disease. *Neurosci Lett.* 2003;339:172-4.
270. Lewczuk P, Esselmann H, Bibl M, Beck G, Maler JM, Otto M, Kornhuber J, Wiltfang J. Tau protein phosphorylated at threonine 181 in CSF as a neurochemical biomarker in Alzheimer's disease. *Jour of Mol Neurosci.* 2004;23:115-22.
271. Ravaglia S, Bini P, Sinforiani E, Franciotta D, Zardini E, Tosca P, i sur. Cerebrospinal fluid levels of tau phosphorylated at threonine 181 inpatients with Alzheimer's disease and vascular dementia, *Neurol Sci.* 2008;29:417–23.
272. Kohnken R, Buerger K, Zinkowski R, Miller C, Kerkman D, DeBernardis J, Shen J, Möller JE, Davies P, Hampel H.. Detection of tau phosphorylated at threonine 231 in cerebrospinal fluid of Alzheimer's disease patients. *Neurosci Lett.* 2000;287:187-90.
273. Vanmechelen E, Vanderstichele H, Davidsson P, Van Kerschaver E, Van Der Perre B, Sjögren M, i sur. Quantification of tau phosphorylated at threonine 181 in human cerebrospinal fluid: a sandwich ELISA with a synthetic phosphopeptide for standardization. *Neurosci Lett.* 2000;285:49-52.
274. Ishiguro K, Ohno H, Arai H, Yamaguchi H, Urukami K, Park JM, i sur. Phosphorylated tau in human cerebrospinal fluid is a diagnostic marker for Alzheimer's disease. *Neurosci Lett.* 1999;270:91-4.
275. Itoh N, Arai H, Urukami K, Ishiguro K, Ohno H, Hampel H, i sur. Large-scale, multicenter study of cerebrospinal fluid tau protein phosphorylated at serine199 for the antemortem diagnosis of Alzheimer's disease. *Ann Neurol.* 2001;50:150-6.
276. Woodford HJ, George J. Cognitive assessment in the elderly: a review of clinical methods. *Q J Med.* 2007;100:469–84.
277. Bravo G, Hebert R. Age- and education-specific reference values for the Mini-Mental and modified Mini-Mental State Examinations derived from a non-demented elderly population. *International Journal of Geriatric Psychiatry.* 1997;12(10):1008-18.
278. Crum RM, Anthony JC, Bassett SS, Folstein MF. Population-based norms for the Mini-Mental State Examination by age and educational level. *JAMA.* 1993;269(18):2386–91.
279. Tombaugh T, McDowell I, Kristjansson B, Hubble A. Mini-Mental State Examination (MMSE) and the Modified MMSE (3MS): A psychometric comparison and normative data. *Psychological Assessment* Mar.1996;8(1):48–59.
280. O'Bryant SE, Humphreys JD, Smith GE, Ivnik RJ, Graff-Radford NR, Petersen RC, Lucas JA. Detecting Dementia with the Mini-Mental State Examination (MMSE) in Highly Educated Individuals. *Arch Neurol.* 2008;65(7):963–7.

281. Boban M, Malojcic B, Mimica N, Vukovic S, Zrilic I, Hofe PR, Simic G. The Reliability and Validity of the Mini-Mental State Examination in the Elderly Croatian Population. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 2012;33:385–92.
282. Nasreddine Z, Phillip NA, Bedirian V, Charbonneau S, Whitehead V, Collin I, Chertkow H. The Montreal Cognitive Assessment, MoCA: A brief screening tool for Mild Cognitive Impairment. *Journal of American Geriatrics Society*. 2005;53(4):695–9.
283. Hachinski V, Iadecola C, Petersen, RC, Breteler MM, Nyenhuis DL, Black SE, Leblanc GG. National Institute of Neurological Disorders and Stroke – Canadian Stroke Network Vascular Cognitive Impairment Harmonization Standards. *Stroke*. 2006;37:2220–41.
284. Freitas S, Simões MR, Lara Alves L, Vicente M, Santana I. Montreal Cognitive Assessment (MoCA): Validation Study for Vascular Dementia. *J Int Neuropsychol Soc*. 2012;18:1031–1040.
285. Freitas S, Simões MR, Alves L, Santana I. Montreal cognitive assessment: validation study for mild cognitive impairment and Alzheimer disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord*. 2013;27(1):37-43.
286. Ciesielska N, Sokołowski R, Mazur E, Podhorecka M, Polak-Szabela A, Kędziora-Kornatowska K. Is the Montreal Cognitive Assessment (MoCA) test better suited than the Mini-Mental State Examination (MMSE) in mild cognitive impairment (MCI) detection among people aged over 60? Meta-analysis. *Psychiatr Pol*. 2016;50(5)1039-52.
287. Trzepacz PT, Hochstetler H, Wang S, Walker B, Saykin AJ. Relationship between the Montreal Cognitive Assessment and Mini-mental State Examination for assessment of mild cognitive impairment in older adults. *BMC Geriatrics*. 2015;15:107-15.
288. Augustinack JC, Schneider A, Mandelkow EA, Hyman BT. Specific tau phosphorylation sites correlate with severity of neuronal cytopathology in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol*. 2002;103:26–35.
289. Kimura T, Ono T, Takamatsu J, Yamamoto H, Ikegami K, Kondo A, Hasegawa M, Ihara Y, Miyamoto E, Miyakawa T. Sequential changes of tau-site-specific phosphorylation during development of paired helical filaments. *Dementia* 1996;7:177–181
290. Reimenschneider M, Wagenpfeil S, Vanderstichele H, Otto M, Wiltfang J, Kretschmar H, et al. Phospho-tau/total tau ratio in cerebrospinal fluids discriminates Creutzfeld-Jakob disease from other dementia. *Mol Psychiatry*. 2003;8:343-7.
291. Mattsson N, Zetterberg H, Hansson O, Andreasen N, Parnetti L, Jonsson M, Herukka SK, van der Flier WM, Blankenstein MA, Ewers M, et al. CSF biomarkers and incipient Alzheimer disease in patients with mild cognitive impairment. *JAMA*. 2009;302:385–93.
292. Šimic G, Boban M, Šarac H, Grbic K, Hof PR, Hamann C, Ackl N, Bader B, Danek A. CSF tau proteins in evaluation of patients with suspected dementia.

- In: *New Trends in Alzheimer and Parkinson related disorders: ADPD 2007*. Medimond, Bologna, pp. 239-43.
293. Hampel H, Buerger K, Zinkowski R, Teipel SJ, Goernitz A, Andreasen N, Sjoegren M, DeBernardis J, Kerkman D, Ishiguro K, et al. Measurement of phosphorylated tau epitopes in the differential diagnosis of Alzheimer disease: A comparative cerebrospinal fluid study. *Arch Gen Psychiat*. 2004;61:95–102.
 294. Boban M. CSF total tau na pshosphrylated tau proteins in the differential diagnosis of dementia. *Disertation*. Zagreb 2009.
 295. The Ronald and Nancy Reagan Research Institute of the Alzheimer's Association and the National Institute on Aging Working Group. Consensus report of the Working Group on: "Molecular and Biochemical Markers of Alzheimer's Disease". *Neurobiol Aging*. 1998; 19(2):109-16.
 296. Hampel H, Buerger K, Kohnken R, Teipel MD, Zinkowski R, Müller HJ, i sur. Tracking of Alzheimer's disease progression with CSF tau protein phosphorylated on threonine 231. *Ann Neurol*. 2001;49:545-6.
 297. Buerger K, Teipel SJ, Zinkowski R, Blennow K, Arai H, Engel R, i sur. CSF tau protein phosphorylated at threonine 231 correlates with cognitive decline in MCI subjects. *Neurology*. 2002;59:627-9.
 298. Hampel H, Buerger K, Zinkowski R, Teipel SJ, Goernitz A, Andreasen N, i sur. Measurement of phosphorylated tau epitopes in the differential diagnosis of Alzheimer disease: a comparative cerebrospinal fluid study. *Arch Gen Psychiatry*. 2004;61(1):95-102.
 299. Wang H, Wang T, Qian S, Ba L, Lin Z, Xiao S. A Pilot Longitudinal Study on Cerebrospinal Fluid (CSF) Tau Protein in Alzheimer's Disease and Vascular Dementia. *Shanghai Arch Psychiatry*. 2016;28(5):271-279.
 300. Blennow K, Zetterberg H, Fagan AM. Fluid Biomarkers in Alzheimer Disease. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012;2:a006221.
 301. Kandimalla RJL, Prabhakar S, Wani WY, Kausha A, Gupta N, Sharma DR i sur. CSF p-Tau levels in the prediction of Alzheimer's disease. *Biology Open*. 2013;2:1119-24.
 302. Roman GC. Defining dementia: clinical criteria for the diagnosis of vascular dementia. *Acta Neurol Scand Suppl*. 2002;178:6–9.
 303. Erkinjuntti T, Rockwood K. Vascular dementia. *Semin Clin Neuropsych*. 2003;8:37–45.
 304. Stefani A, Bernardini S, Panella M, Peiratnozzi M, Nuccetelli M, Koch G, i sur. AD with subocortical white matter lesions and vascular dementia: CSF markers for differnetial diagnosis. *Journal of the Neurol Sci*. 2005;237;83-8.
 305. Engelborghs S, Le Bastard N, Feyen B, Goeman J, Marin J, De Deyn PP. Overdiagnosis of vascular dementia using structural brain imaging in the cotext of stanard clinical diagnostic criteria: Alzheimer's Association International Conference 2011.
 306. Engelborghs S, De Vreese K, Van de Castele T, Vanderstichele H, Van Everbroeck B, Cras P, I sur. Diagnostic peroframnce of a CSF biomarker panel in autopsy-confirmed dementia. *Neurobiol Aging*. 2008;29:1143-59.

307. Galasko D, Chang L, Motter R, Clark CM, Kaye J, Knopman D, Thomas R, Kholodenko D, Schenk D, Lieberburg I, i sur. High cerebrospinal fluid tau and low amyloid β_{1-42} levels in the clinical diagnosis of Alzheimer disease and relation to apolipoprotein E genotype. *Arch Neurol.* 1998;55:937–945.
308. Mattsson N, Zetterberg H, Hansson O, Andreasen N, Parnetti L, Jonsson M, i sur. CSF biomarkers and incipient Alzheimer disease in patients with mild cognitive impairment. *JAMA.* 2009;302:385–93.
309. Van Harten AC, Kester MI, Visser PJ, Blankensteine MA; Pijnenburg YAL, van der Flier WM, Scheltens P. Tau and p-tau as CSF biokarkers in dementia: a meta analysis. *Lin Chem Lab Med.* 2011;49(3):353-66.
310. Liu B, Tang Y, shen Y, Cen L, Han M. Cerebrospinal fluid tau protein in differential diagnosis of Alzheimer's disease and vascular dementia in Chinese population: a meta-analysis. *Alzheimers Dement.* 2014;29(2):116-22.
311. Boban M, Grbić K, Mladinov M, Hof PR, Süßmair C, Ackl N, i sur. Cerebrospinal fluid markers in differential diagnosis of Alzheimer's disease and vascular dementia. *Coll Antropol.* 2008;32(1):31-6.
312. Galasko D, Hansen LA, Katzman R, Wiederholt W, Masliah E, Terry R, i sur. Clinacal-neuropathological cerrelations in Alzheimer's disease and related dementias. *Arch Neurol.* 1994;51:888-95.
313. Babić M, Vogrinc Ž, Diana A, Klepac N, Borovečki F, Hof PR, Šimić G. Comparison of two commercial enzyme-linked immunosorbent assays for cerebrospinal fluid measurement of amyloid β_{1-42} and total tau. *Transl Neurosci.* 2013;4(2).

12. ŽIVOTOPIS

Spomenka Kiđemet-Piskač, rođena je 12.08.1970. u Varaždinu, gdje je završila osnovnu školu i kulturno-znanstveni smjer Gimnazije Varaždin. Diplomirala je 1995. godine na Medicinskom fakultetu u Zagrebu. Nakon dvogodišnjeg pripravničkog staža (uz prekid zbog porodiljnog dopusta) položila je stručni ispit i od Hrvatske liječnike komore dobila odobrenje za samostalan rad u veljači 1998. Nakon kraćeg rada u Primarnoj zdravstvenoj zaštiti, od srpnja 1998. zaposlena je na Odjelu neurologije Opće bolnice Varaždin, prvo kao specijalizant neurologije, a od 2004. kao specijalist neurolog (uz prekid zbog drugog porodiljnog dopusta). U sklopu specijalizacije iz neurologije završila je stručni poslijediplomski studij Klinička neurologija, te nakon toga Doktorski studij Biomedicina i zdravstvo na Medicinskom fakultetu u Zagrebu. 2007. završila je edukaciju iz ekstra i intrakranijskog doplera, 2008. edukaciju Transkranijski dopler u dokazivanju moždane smrti, 2011. edukaciju iz Kliničke elektromioneurografije, 2012. edukaciju iz Transkranijskog kolorom kodiranog doplera. Od 2008. kao glavni ispitivač provodi klinička ispitivanja iz područja demencije, moždanog udara i multiple skleroze po principima dobre kliničke prakse. Redoviti je sudionik raznih tečajeva stručnog usavršavanja I. kategorije te brojnih kongresa u Hrvatskoj i inozemstvu. Autor je ili koautor više stručnih i znanstvenih članaka u međunarodnim i domaćim časopisima.