

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Ena Španić

**Izraženost biljega Iba1, CD68 i HLA-DR aktiviranih  
mikroglia stanica u hipokampalnoj formaciji osoba  
oboljelih od Alzheimerove bolesti**

Diplomski rad

Zagreb, 2018.

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za razvojnu neuropatologiju na Odsjeku za razvojnu neuroznanost Hrvatskog instituta za istraživanje mozga pod vodstvom prof. dr. sc. Gorana Šimića. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra eksperimentalne biologije (mag. biol. exp.).

## *Zahvala*

*Zahvaljujem se mentoru Goranu Šimiću na ukazanom povjerenju, stručnom vođenju, nesebičnom dijeljenju znanja i pruženoj prilici za izradu diplomskog rada.*

*Zahvaljujem se Katarini Ilić koja je uvijek bila spremna pomoći, te svojim znanjem, podrškom, ljubaznošću i savjetima uvelike olakšala izradu diplomskog rada.*

*Zahvaljujem se profesorici Dubravki Hranilović na stručnom vodstvu, savjetima i susretljivosti tijekom pisanja diplomskog rada.*

*Zahvaljujem se Mirjani Babić Leko, Lei Langer Horvat i ostalim djelatnicima Laboratorija za razvojnu neuropatologiju koji su mi obogatili znanje rada u laboratoriju i uvijek bili voljni pomoći.*

*Veliko hvala mojim roditeljima koji su mi svojim strpljenjem, ljubavlju i podrškom bili najveći oslonac tijekom studiranja koje bez njih ne bi bilo niti moguće.*

*Hvala i ostatku moje obitelji, prijateljima i dečku Luki na pruženoj ljubavi i na svakoj riječi podrške uz koju bi svi problemi postajali lakši, te mom djedu Ivanu koji će mi uvijek biti uzor u svemu što radim.*

## **TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA**

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

### **IZRAŽENOST BILJEGA Iba1, CD68 I HLA-DR AKTIVIRANIH MIKROGLIJA STANICA U HIPOKAMPALNOJ FORMACIJI OSOBA OBOLJELIH OD ALZHEIMEROVE BOLESTI**

Ena Španić

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Brojna istraživanja govore o štetnom utjecaju upalnih procesa i mikroglia stanica na razvoj Alzheimerove bolesti (AB). Stoga se u okviru diplomskog rada imunohistokemijskom metodom analizirao izražaj biljega prisutstva i aktivacije mikroglia stanica Iba1, CD68 i HLA-DR u uzorcima hipokampalne formacije zahvaćenim Alzheimerovom bolešću i kontrolnim uzorcima. Ciljevi istraživanja bili su ispitati izraženost biljega u područjima hipokampalne formacije (sloj zrnatih stanica nazubljene vijuge, hilus, CA3/2, CA1, subikul, bijela tvar), utvrditi postoji li pozitivna korelacija izražaja biljega s duljinom trajanja AB i usporediti izražaj biljega aktivirane mikroglie, CD68 i HLA-DR s brojem amiloidnih plakova i neurofibrilarnih snopića u područjima hipokampalne formacije. Istraživanje je pokazalo da se izražaj biljega mikroglia stanica razlikuje u mozgu osoba oboljelih od AB i kontrolnih ispitanika. Pronađena je pozitivna korelacija izražaja biljega aktivirane mikroglie, CD68 i HLA-DR s pojavom AB i njihov povećani izražaj u područjima hipokampalne formacije koja su najviše zahvaćena patologijom AB, te negativna korelacija izražaja Iba1 s AB. Dobiveni rezultati podupiru hipoteze o ulozi upale u neurodegenerativnim bolestima i štetnom utjecaju mikroglia stanica u AB.

(50 stranica, 9 slika, 5 tablica, 88 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: Alzheimerova bolest, upala, mikroglia stanice, imunohistokemija

Voditelj: dr. sc. Goran Šimić, dr. med., red. prof.

Suvoditelj: dr. sc. Dubravka Hranilović, red. prof.

Ocjenitelji: dr. sc. Dubravka Hranilović, red. prof.; dr. sc. Jasna Lajtner, izv. prof.; dr. sc. Marin Ježić, doc.

Rad prihvaćen: 4.7.2018.

## **BASIC DOCUMENTATION CARD**

University of Zagreb

Faculty of science

Division of Biology

Graduation Thesis

### **EXPRESSION OF ACTIVATED MICROGLIA CELLS MARKERS Iba1, CD68 AND HLA-DR IN THE HIPPOCAMPAL FORMATION OF PATIENTS WITH ALZHEIMER'S DISEASE**

Ena Španić

Rooseveltovej trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Numerous studies indicate the harmful effect of inflammatory processes and microglia cells in Alzheimer's disease (AD). Therefore, within the graduate thesis, we analyzed expression of microglia cells markers Iba1, CD68 and HLA-DR in the hippocampal formation of patients with Alzheimer's disease and control samples. The main goals were to determine expression of markers in the different areas of hippocampal formation (granular cell layer of dentate gyrus, hilus, CA2/3, CA1, subiculum and white matter), to determine whether there is a positive correlation between expression of the markers and the duration of AD and to compare the expression of activated microglia cells markers, CD68 and HLA-DR with numbers of amyloid plaques and neurofibrillary tangles in different areas of hippocampal formation. The research has shown that the expression of microglia markers differs in the AD brains and controls. There was a positive correlation between expression of activated microglia cells markers CD68 and HLA-DR with the AD and their higher expression in the areas of hippocampal formation most affected by AD pathology and the negative correlation of expression of Iba1 with the AD. These results support the inflammatory hypothesis of neurodegenerative diseases and the harmful effect of the microglia cells in the AD.

(50 pages, 9 figures, 5 tables, 88 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library

Key words: Alzheimer's disease, inflammation, microglia cells, immunohistochemical method

Supervisor: Goran Šimić, prof.

Cosupervisor: Dubravka Hranilović, prof.

Reviewers: Dubravka Hranilović, prof.; Jasna Lajtner, assoc. prof.; Marin Ježić, asst. prof.

Thesis accepted: 4.7.2018.

## POPIS KRATICA

AB	Alzheimerova bolest
<i>ABCA7</i>	Gen uključen u metabolizam kolesterola (od eng. <i>ATP Binding Cassette Subfamily A Member 7</i> )
A $\beta$	Amiloid-beta
A $\beta$	Amiloid-beta dug 42 aminokiseline
ApoE	Apolipoprotein E
APP	Prekursorni protein amiloida (od eng. <i>Amyloid Precursor Protein</i> )
BBB	Krvno-moždana barijera (od eng. <i>Blood-brain Barrier</i> )
<i>BINI</i>	Gen uključen u recikliranje endosoma (od eng. <i>Bridging Integrator 1</i> )
BSA	Goveđi serumski albumin (od eng. <i>Bovine Serum Albumin</i> )
BT	Bijela tvar
CD200	Membranski glikoprotein na neuronima
CD200R	Receptor za CD200
CD68	Diferencijacijski antigen mikroglia stanica (od eng. <i>clusters of differentiation</i> )
CERAD	Od eng. <i>Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease</i>
<i>CLU</i>	Gen za klasterin (od eng. <i>Clusterin</i> )
CNS	Središnji živčani sustav (od eng. <i>Central Nervous System</i> )
<i>CR1</i>	Gen za receptor komplementa 1 (od eng. <i>Complement receptor type 1</i> )
CT	Kompjutorizirana tomografija (od eng. <i>Computed Tomography</i> )
CX3CL1	Fraktalkin
CX3CL1R	Receptor za fraktalkin
<i>CYP46A</i>	Gen za kolesterol 24-hidroksilaza, iz skupine citokrom P450 enzima
DAB	Diaminobenzidin
DAMP	Molekularni obrasci oštećenja (od eng. <i>Damage-Associated Molecules Pattern</i> )
EAA	ekscitatorne aminokiseline (od eng. <i>Excitatory Amino Acid</i> )
F-aktin	Nitasti aktin (od eng. <i>Filamentous Actin</i> )
GD	Gyrus dentatus
<i>GLIS1</i>	Gen za glis protein (od eng. <i>Glis Family Zinc Finger 1</i> )
HLA-DR	Ljudski leukocitni antigen (od eng. <i>Human Leukocyte Antigen</i> )
HO-1	Hem oksigenaza 1
HSV-1	<i>Herpes simplex virus 1</i>
Iba1	Ionizirana kalcij-vezujuća adaptorska molekula 1 (od eng. <i>Ionized calcium Binding Adaptor molecule 1</i> )
Ig	Imunoglobulin

IGF-1	Inzulinu sličan faktor rasta 1 (od eng. <i>insulin-like growth factor 1</i> )
IL	Interleukin
IRF5	Regulatorni faktor interferona 5 (od eng. <i>Interferon-Regulatory Factor 5</i> )
LPS	Lipopolisaharid
LTP	Dugotrajna potencijacija (od eng. <i>Long-Term Potentiation</i> )
MHC-II	Glavni kompleks tkivne podudarnosti (od eng. <i>major histocompatibility complex</i> )
MMSE	Kratko ispitivanje mentalnog statusa (od eng. <i>Mini Mental Status Examination</i> )
MRI	Slikovni prikaz magnetskom rezonancijom (od eng. <i>Magnetic Resonance Imaging</i> )
NGS	Serum koze (od eng. <i>Normal Goat Serum</i> )
NFS	Neurofibrilarni snopići
NIA	Nacionalni institut za starenje (od eng. <i>National Institute on Aging</i> )
NINCDS-ADRDA	Od eng. <i>National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke and Alzheimer's Disease and Related Disorders Association</i>
NO	Dušikov oksid (od eng. <i>Nitric Oxide</i> )
<i>NOTCH-3</i>	od eng. <i>Neurogenic locus notch homolog protein 3</i>
NRF2	Od eng. <i>Nuclear factor erythroid 2-Related Ractor 2</i>
NSAID	Nesteroidni protuupalni lijekovi (od eng. <i>Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs</i> )
PAMP	Molekularni uzorci patogena (od eng. <i>Pathogen-Associated Molecules Pattern</i> )
PBS	Fosfatni pufer (od engl. <i>Phosphate Buffered Saline</i> )
PET	Pozitronska emisijska tomografija (od eng. <i>Positron Emission Tomography</i> )
PHF	Upareni zavojiti filamenti (od eng. <i>Paired Helical Filament</i> )
<i>PICALM</i>	Gen za fosfatidilinozitol vezujući protein za skupljanje klatrina (od eng. <i>Phosphatidylinositol Binding Clathrin Assembly Protein</i> )
PLD3	Fosfolipaza D3 (od eng. <i>Phospholipase D; Family Member 3</i> )
PSEN1/2	Geni za presenilin
ROS	Reaktivni oblici kisika (od eng. <i>Reactive Oxygen Species</i> )
<i>SERPINB1</i>	Gen za serpin B1 (od eng. <i>Serpin Family B Member 1</i> )
<i>SOR1</i>	Gen za receptor za sortilin (od eng. <i>Sortilin Related Receptor 1</i> )
SR	Receptori čistači od (eng. <i>Scavenger Receptors</i> )
SUB	subikulum
TGF- $\beta$	Transformirajući faktor rasta beta (od eng. <i>Transforming Growth Factor-<math>\beta</math></i> )
TLR	od eng. <i>Toll-like receptors</i>
TNF- $\alpha$	Faktor tumorske nekroze-alfa (od eng. <i>Tumor Necrosis Factor-<math>\alpha</math></i> )
TREM2	od eng. <i>Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells 2</i>

# SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1. ALZHEIMEROVA BOLEST .....	1
1.2. PATOGENEZA ALZHEIMEROVE BOLESTI .....	2
1.3. ULOGA GENA U ALZHEIMEROVOJ BOLESTI .....	6
1.3.1. NASLJEDNI OBLIK ALZHEIMEROVE BOLESTI .....	6
1.3.2. SPORADIČNI OBLIK ALZHEIMEROVE BOLESTI .....	7
1.4. OSTALE TEORIJE NASTANKA ALZHEIMEROVE BOLESTI .....	7
1.4.1. KOLINERGIČNA HIPOTEZA .....	7
1.4.2. OKSIDATIVNA HIPOTEZA .....	8
1.4.3. HIPOTEZA MITOHONDRIJSKE KASKADE .....	8
1.4.4. HIPOTEZA NASTANKA ALZHEIMEROVE BOLESTI USLIJED INFEKCIJE .....	9
1.4.5. UPALNA HIPOTEZA .....	9
1.5. UPALA U SREDIŠNJEM ŽIVČANOM SUSTAVU .....	9
1.5.1. MIKROGLIJA STANICE .....	10
1.5.1.1. FENOTIPOVI M1 I M2 MIKROGLIJA STANICA .....	11
1.5.1.2. BILJEZI ZA ISTRAŽIVANJE MIKROGLIJA STANICA .....	13
1.5.1.3. PROMJENE MIKROGLIJA STANICA TIJEKOM STARENJA .....	15
1.5.2. UPALA U ALZHEIMEROVOJ BOLESTI .....	17
1.5.3. STRATEGIJE ZA KONTROLU UPALE U ALZHEIMEROVOJ BOLESTI ..	19
2. CILJEVI .....	21
3. MATERIJALI I METODE .....	22
3.1. MATEIJALI .....	22
3.2. METODE .....	24
4. REZULTATI .....	27
4.1. IZRAŽENOST BILJEGA IBA1 .....	27
4.2. IZRAŽENOST BILJEGA CD68 .....	31
4.3. IZRAŽENOST BILJEGA HLA-DR .....	35
5. RASPRAVA .....	38
6. ZAKLJUČAK .....	41
7. LITERATURA .....	42
8. ŽIVOTOPIS .....	50



# 1. UVOD

## 1.1. ALZHEIMEROVA BOLEST

Alzheimerova bolest (AB) najčešći je primarni uzrok sindroma demencije. Prema podacima Svjetske zdravstvene organizacije od demencije danas diljem svijeta boluje oko 50 milijuna ljudi, od kojih je čak 60-70% slučajeva uzrokovano Alzheimerovom bolešću. Učestalost demencije raste sa starošću, 1% slučajeva demencije javlja se u dobi između 60 i 64 godina nakon čega se bilježi gotovo eksponencijalni porast (Blennow *i sur.*, 2006.).

Bolest je prvi opisao dr. Alois Alzheimer 1907. godine u pacijentice Auguste D. koja je pokazivala brzo napredujuće simptome, kao što su poteškoće s pamćenjem, poremećaj spavanja, zbunjenost i promjenu ponašanja. Nakon njene smrti dr. Alzheimer je opisao dotad nepoznate histopatološke pojave u mozgu, danas definirane kao plakovi i neurofibrilarni snopići (Hippius i Neundörfer, 2003.).

Alzheimerova bolest je progresivna neurodegenerativna bolest koju karakterizira propadanje sinapsi i neurona kortikalnih i subkortikalnih regija mozga te narušavanje funkcije neurotransmiterskih sustava (Lyness *i sur.*, 2003.; Šimić *i sur.*, 2017.). Propadanje sinapsi i neurona posljedično izaziva narušavanje kognitivnih funkcija, gubitak pamćenja, promjene ponašanja kao što su agresivnost i depresivno ponašanje (Hope *i sur.*, 1997.), a napredovanjem bolesti simptomi mogu doseći stadij u kojem oboljeli nisu u stanju obavljati svakodnevne aktivnosti. Još se sa sigurnošću ne zna što uzrokuje AB, ali zna se da na patogenezu AB utječu brojni genski i okolišni čimbenici kroz dugi niz godina. Starenje je najznačajniji rizični faktor za razvoj bolesti, a brojne studije pokazuju i niz drugih rizičnih čimbenika kao što su smanjena mentalna i fizička aktivnost tijekom života, ozljede glave, kardiovaskularne bolesti, pretilost, pušenje i dijabetes (Jellinger, 2004.; Mayeux, 2003.).

Za kliničku dijagnozu AB najčešće se koriste kriteriji NINCDS-ADRDA (od eng. *National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke and Alzheimer's Disease and Related Disorders Association*) objavljeni 1984. godine koji su 2011. godine prilagođeni današnjim saznanjima i uključuju širi pogled patogeneze AB. Grupe oformljene od strane NIA (od eng. *National Institute on Aging*) i *Alzheimer's Association* upotpunile su kriterije iz 1984. godine te podijelili progresiju AB u tri stadija: 1) rani, pretklinički stadij, 2) srednji stadij s blagim kognitivnim poremećajima i 3) stadij sa simptomima demencije. Novi kriteriji jasnije definiraju razlike između demencije uzrokovane AB i ostalih demencija i

povezanost s poremećajima koji mogu utjecati na razvoj AB kao što su npr. vaskularne bolesti. Važna nadopuna dijagnostičkih kriterija je upotreba biljega u dijagnosticiranju AB (Albert *i sur.*, 2011.; McKhann *i sur.*, 2011.; Sperling *i sur.*, 2011.). Dijagnoza se postavlja temeljem testiranja kognitivnih sposobnosti, u te svrhe koristi se Mala ljestvica mentalnih sposobnosti - MMSE ljestvica (od eng. *Mini Mental Status Examination*) i neurološkog pregleda. On može uključivati i snimanje mozga kompjutoriziranom tomografijom (CT, od eng. *computed tomography*), magnetskom rezonancijom (MRI, od eng. *magnetic resonance imaging*) ili pozitronskom emisijskom tomografijom (PET, od eng. *positron emission tomography*). Time se može vidjeti postoji li atrofija moždane kore (CT i MRI), odnosno smanjena aktivnost (PET) pojedinih moždanih regija. Provodi se i analiza biljega kao što su koncentracija amiloida  $\beta$  satavljenog od 42 aminokiseline ( $A\beta_{42}$ ) te ukupnog i fosforiliranog proteina tau u cerebrospinalnoj tekućini te vizualizacija amiloida  $\beta$  radioaktivnim markerima. Upotreba takvih biljega upotpunjuje kliničku sliku i doprinosi postavljanju točnije dijagnoze, no važno je naglasiti kako mnogi od njih nisu dovoljno specifični za dijagnozu AB i mogu se javiti i u drugih oblika demencije ili ozljeda središnjeg živčanog sustava (CNS, od eng. *central nervous system*). Smatra se da bolest započinje godinama prije pojave prvih simptoma. Stoga je krajnji cilj upotreba biljega u svrhu što ranijeg otkrivanja bolesti, prije razvoja prvih kliničkih znakova kako bi se mogle poduzeti eventualne preventivne mjere i usporiti daljnje napredovanje bolesti. Na žalost dosad poznati biljezi nisu primjenjivi u tu svrhu. (Jack *i sur.*, 2011.).

## **1.2. PATOGENEZA ALZHEIMEROVE BOLESTI**

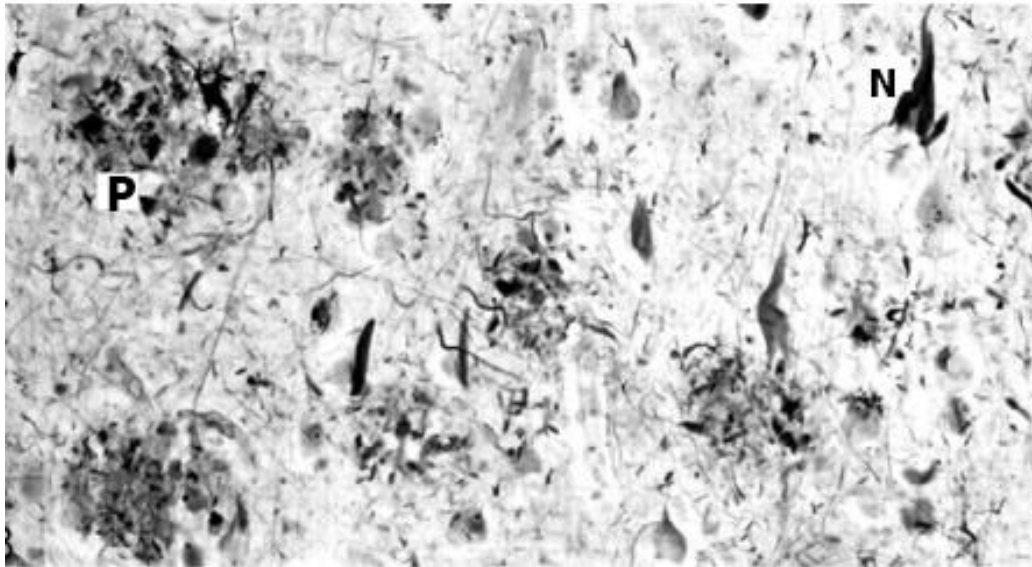
Na mikroskopskoj razini glavna histopatološka obilježja AB su izvanstanično nakupljanje amiloida  $\beta$  ( $A\beta$ ), najprije u obliku difuznih depozita, a zatim i amiloidnih plakova (Hardy *i sur.*, 1992.), unutarstanična akumulacija hiperfosforiliranog proteina tau te gubitak neurona, prvenstveno kolinergičkih, noradrenergičkih i serotonergičkih. Morfološki gledano, najranjiviji su piramidni neuroni (Bierer *i sur.*, 1995.; Braak i Braak, 1991a.; Palmer i Palmer, 2002.).

Nakon otkrića da je  $A\beta$  glavni strukturni protein amiloidnih plakova (Slika 1.) (Masters *i sur.*, 1985.) nastala je hipoteza amiloidne kaskade, jedna od glavnih hipoteza o uzroku AB. Prema toj hipotezi neravnoteža između proizvodnje i uklanjanja  $A\beta$  u mozgu je glavni patološki proces koji dalje pokreće sve druge patološke promjene koje u konačnici rezultiraju neurodegeneracijom (Hardy *i sur.*, 1992.).  $A\beta$  je protein koji nastaje cijepanjem amiloidnog prekursorskog proteina (APP, od eng. *amyloid precursor protein*). Ovisno o mjestu cijepanja i

enzimima koji ga posreduju mogu nastati produkti različite duljine. Ukoliko se APP pocijepa  $\beta$  sekretazom i zatim  $\gamma$  sekretazom, nastaje  $A\beta$ . Ako pak APP najprije pocijepa  $\alpha$  sekretaza nastaje drugi produkt koji ne sudjeluje u formiranju plakova (Asionowski *i sur.*, 1999.; Vassar *i sur.*, 1999.). U plakovima se najčešće može naći  $A\beta$  sastavljen od 42 aminokiseline koji ima veću tendenciju agregacije u nakupine. Hipotezu potkrepljuju istraživanja mutacija gena *APP*, gena za presenilin *PSEN1* i *PSEN2* povezanih s nastankom nasljednog tipa AB koji se uobičajeno javlja prije 65. godine života. Mutacije u genu *APP* dovode do prekomjerne produkcije  $A\beta$  pa s time i njegovog nakupljanja (Selkoe, 2001.; Tokuda *i sur.*, 1997.), a mutacije u genima *PSEN1* i *PSEN2* do nastajanja  $A\beta_{42}$ . Iako se ne zna kako točno plakovi pokreću daljnje patološke procese, poznato je da narušavaju homeostazu kalcija, povećavajući njegovu unutarstaničnu koncentraciju. Fosforilacija proteina tau može biti kontrolirana unutarstaničnim kalcijem pa bi to mogao biti mehanizam kojim plakovi potiču stvaranje neurofibrilarnih snopića (Hardy *i sur.*, 1992.).

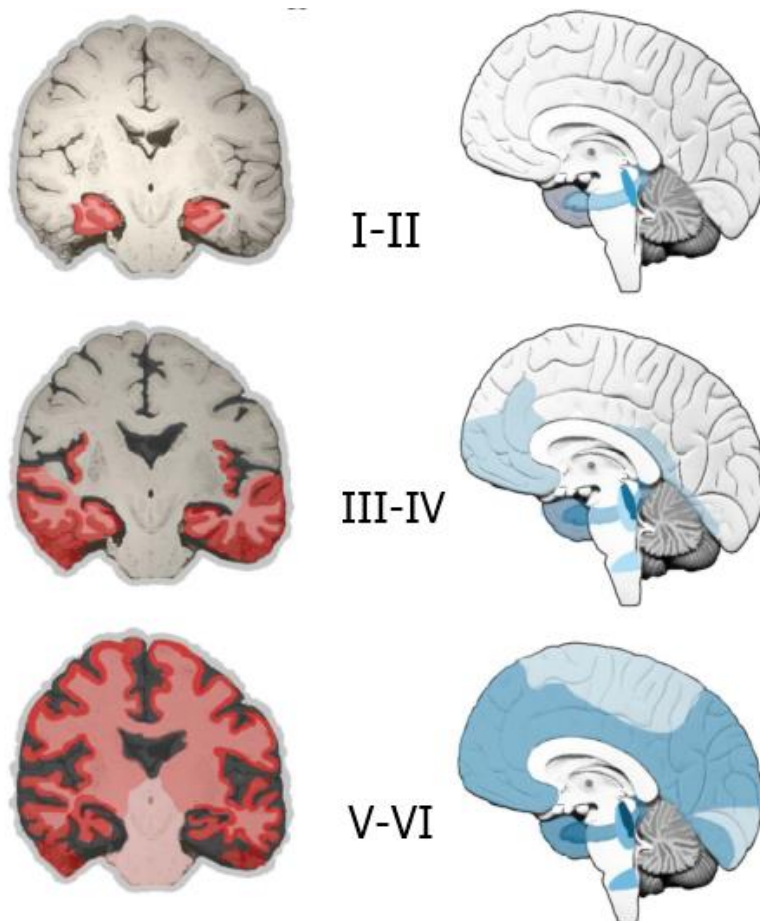
Amiloidni plakovi imaju jezgru sačinjenu od fibrila amiloida koju okružuju distrofični neuriti, reaktivne mikroglia stanice i astrociti. Za razliku od plakova, difuzne nakupine amiloida nisu združene s distrofičnim neuritima i mikroglia stanicama, a smatra se da su one početni stadij nastajanja plakova (Hardy i Allsop, 1991.).

Unutarstanična akumulacija hiperfosforilanog proteina tau u obliku neurofibrilarnih snopića (NFS) (Slika 1.), drugo je glavno histopatološko obilježje AB (Braak i Braak, 1991b.). NFS se sastoje od dvije duge, nerazgranate podjedinice koje čine zavojnicu (PHF, od eng. *paired helical filament*). U fiziološkim uvjetima tau je vezan za mikrotubule i kontrolira njihovo formiranje, te ih čini stabilnima. Fosforilacija igra važnu ulogu u regulaciji aktivnosti proteina tau, a prema „tau“ hipotezi o nastanku AB hiperfosforilacija je glavni korak koji vodi ka formiranju NFS (Braak *i sur.*, 1994.) jer uzrokuje degradaciju mikrotubula i nakupljanje proteina tau. Dokazano je da nastanak NFS bolje korelira s gubitkom kognitivnih sposobnosti i progresijom AB nego nakupljanje  $A\beta$  (Arriagada *i sur.*, 1992.; Bierer *i sur.*, 1995.). Usporedbom patoloških uzoraka različitih stadija AB vidjelo se da progresijom bolesti NFS zahvaćaju dijelove mozga najčešće po istom uzorku. Stoga je napravljena shema topografske progresije bolesti. S obzirom na dijelove mozga zahvaćene NFS, pa posljedično i degeneracijom, bolest se dijeli na 6 Braakovih stadija (Slika 2.) (Braak i Braak, 1991a.).



**Slika 1.** Nakupine amiloida  $\beta$  u obliku plakova (**P**) i hiperfosforiliranog proteina tau u obliku neurofibrilarnih snopića (**N**) u hipokampusu; preuzeto iz: Wippold *i sur.*, 2008.

Inicijalni stadiji bolesti I i II nazivaju se još i transentorinalni stadiji jer se patološke promjene u mozgu šire iz entorinalne regije do hipokampalne formacije. Klinički se stadiji I i II manifestiraju kao gubitak pamćenja nedavnih događaja, blaga prostorna dezorijentacija i minimalne poteškoće u svakodnevnim aktivnostima. Opće kognitivne funkcije ostaju sačuvane. U stadijima III i IV bolest zahvaća sljepoočnu, tjemenu i čeonu moždanu regiju. Klinički se javljaju poteškoće s prisjećanjem, otežano pronalaženje adekvatne riječi, vremenska i prostorna dezorijentacija, otežana koncentracija, razumijevanje i konceptualizacija. U završnim stadijima V i VI degeneracija zahvaća osjetna i motorička područja neokorteksa što rezultira poteškoćama prepoznavanja objekta i drugih percepcijskih i motoričkih vještina (Braak i Braak, 1991a.).



**Slika 2.** Topografska progresija patoloških promjena NFS u AB kroz 6 Braakovih stadija; preuzeto i prepravljeno iz: Šimić *i sur.*, 2017.

Pretpostavlja se da je posljedica stvaranja i širenja amiloidnih plakova i neurofibrilarnih snopića gubitak neurona. Najranjiviji tip neurona u AB su piramidni neuroni, a njihovi glavni neurotransmiteri su ekscitatorne aminokiseline (EAA, od eng. *excitatory amino acid*) glutamat i aspartat koje imaju važnu ulogu u procesu pamćenja. Pamćenje je proces koji nastaje promjenom jakosti sinapsi između neurona. Neurokemijska podloga učvršćenja sinapsi, pa s time i pamćenja je dugotrajna potencijacija (LTP, od eng. *long-term potentiation*). Ukratko, u osnovi toga procesa je povećanje učinkovitosti sinaptičkog prijenosa uslijed visoke frekvencije stimulacije sinapsi (Bliss i Collingridge, 1993.). Istraživanja koja su uključivala antagoniste receptora za EAA i modele miševa s delecijom gena za te receptore pokazala su otežano pamćenje kod modelnih organizama, što potvrđuje ulogu EAA u procesima koji omogućuju pamćenje (Martin i Morris, 2002.; Robbins i Murphy, 2006.). Gubitak kognitivnih funkcija povezan je i s odumiranjem kolinergičnih neurona (Davies P i Maloney AJ., 1979.; Schliebs i Arendt, 2011.), a promjene ponašanja, raspoloženja, poteškoće sa spavanjem i usmjeravanjem

pažnje osnovu imaju u propadanju serotonergičnih i noradrenergičnih neurona (Mega *i sur.*, 1996.; Palmer, 1996.).

Ne zna se sa sigurnošću zašto su određeni neuroni i regije mozga podložniji patologiji AB, dok drugi ostaju pošteđeni sve do krajnjih faza bolesti. Opisana je korelacija između selektivne osjetljivosti pojedinih neurona i slijeda mijelinizacije tijekom razvoja mozga. Područja koja mijeliniziraju kasnije razvijaju NFS ranije i u većoj koncentraciji. Osim toga, neuroni koji imaju duge, tanke aksone s tanjim mijelinskim omotačem podložniji su nastajanju NFS od bogatije mijeliniziranih neurona s kraćim aksonima (Braak *i sur.*, 1999.).

### **1.3. ULOGA GENA U ALZHEIMEROVOJ BOLESTI**

Genetika Alzheimerove bolesti vrlo je kompleksna. Većina slučajeva AB je takozvani sporadični oblik u čiji nastanak je uključeno mnogo faktora i neke varijante gena čija prisutnost povećava rizik od oboljenja. Samo oko 1% slučajeva AB čine nasljedni ili obiteljski oblici koji su direktno povezani s brojnim mutacijama nekoliko gena.

#### **1.3.1. NASLJEDNI OBLIK ALZHEIMEROVE BOLESTI**

Nasljedni oblik AB nasljeđuje se autosomno dominantno i uzrokovan je nekom od dvjestotinjak mutacija u genima *APP*, *PSEN1* ili *PSEN2*. U slučaju nasljednog oblika simptomi se uobičajeno javljaju prije 65. godine života. Gen *APP* nalazi se na kromosomu 21 i povezan je s nastankom AB nakon otkrića da su plakovi u osoba sa Downovim sindromom i oboljelih od AB građeni od istog peptida, A $\beta$  (Glennner i Wong, 1984.), te prvih mutacija gena *APP* nađenih u osoba s AB (Goate *i sur.*, 1991.). Mutacije *APP* dovode do promjene mjesta cijepanja *APP*-a jednom od sekretaza ( $\alpha$ ,  $\beta$  ili  $\gamma$ ) što rezultira povećanim stvaranjem A $\beta$ . Osim takvih mutacija, duplikacije gena *APP* također uzrokuju povećanu produkciju A $\beta$ , što se događa i kod trisomije kromosoma 21, tj. kod osoba sa Downovim sindromom (Selkoe, 2001.; Tokuda *i sur.*, 1997.). Zanimljivo je da je pronađena i vrlo rijetka mutacija gena *APP* koja doprinosi smanjenom opadanju kognitivnih sposobnosti i smatra se da štiti od pojave AB (Jonsson *i sur.*, 2012.).

Većinu slučajeva nasljednog oblika AB uzrokuju mutacije u genima *PSEN1* na kromosomu 14 (St George-Hyslop *i sur.*, 1992.) i *PSEN2* na kromosomu 1 (Levy-Lahad *i sur.*, 1995.). Geni *PSEN1* i *PSEN2* kodiraju za proteine presenilin 1 i 2 koji su dio kompleksa  $\gamma$ -sekretaze koja cijepa *APP* na nekoliko mjesta, čime nastaje A $\beta$  različitih duljina. Sve mutacije

*PSEN1* i *PSEN2* dovode do povećanog stvaranja A $\beta$  sastavljenog od 42 aminokiseline koji je više sklon nakupljanju u plakove (Citron *i sur.*, 1997.).

### **1.3.2. SPORADIČNI OBLIK ALZHEIMEROVE BOLESTI**

Oko 99% slučajeva AB čini sporadični oblik, a incidencija sporadičnog oblika raste gotovo eksponencijalno nakon 65. godine života sve do otprilike 85 godina starosti, nakon čega se više ne povećava. Analiza 11884 parova blizanaca procijenila je nasljednost sporadičnog oblika bolesti na 58-79% (Gatz *i sur.*, 2006.). Najvažniji rizični čimbenik za sporadičnu Alzheimerovu bolest je alel  $\epsilon 4$  gena za apolipoprotein E (*APOE*) (Corder *i sur.*, 1993.). Jedan alel  $\epsilon 4$  povećava relativni rizik za nastanak bolesti 5 puta, a oba više od 20 puta. Apolipoprotein E (ApoE) uključen je u održavanje homeostaze lipida, posredujući prijenos kolesterola među tkivima, te u popravak ozljeda u mozgu, metabolizam glukoze, upalne procese u CNS-u i funkciju mitohondrija. U CNS-u ApoE najviše proizvode astrociti, a transport lipida do neurona odvija se preko ApoE receptora. ApoE ima važnu ulogu i u metabolizmu A $\beta$  regulirajući njegovo nakupljanje i uklanjanje iz mozga (Liu *i sur.*, 2013.).

Ostali, do sada otkriveni polimorfizmi povezani s povećanom vjerojatnošću za nastanak bolesti uključuju gene povezane s recikliranjem endosoma (*BINI*, *PICALM*, *SORLI*), metabolizmom kolesterola (*ABCA7*, *CYP46A*), imunskim sustavom (*CLU*, *CRI*), mikroglija stanicama (*TREM2*), lizosomalnim enzimima *PLD3*, supstratima za  $\gamma$ -sekretazu (*NOTCH-3*) i drugima (*GLIS1*, *SERPINB1*, itd.) (Giri *i sur.*, 2016.).

## **1.4. OSTALE TEORIJE NASTANKA ALZHEIMEROVE BOLESTI**

Uz već spomenute dominantne hipoteze o nastanku AB, hipotezu amiloidne kaskade i tau hipotezu, postoje mnoge druge koje nastoje potkrijepiti i objasniti uzroke nastanka i napredovanja bolesti.

### **1.4.1. KOLINERGIČNA HIPOTEZA**

Jedna od najstarijih hipoteza o nastanku AB je kolinergična hipoteza koja kaže da degeneracija kolinergičnih neurona značajno doprinosi pogoršanju kognitivnih sposobnosti. Potvrda toj hipotezi je važna uloga acetilkolina u procesima pamćenja (Drachman i Leavitt, 1974.) i pronađena pozitivna korelacija između stupnja kognitivnih poremećaja i smanjenja koncentracije acetilkolina. Sinteza acetilkolina posredovana je kolin acetiltransferazom, a smanjena aktivnost tog enzima zamijećena je u AB (Davies P i Maloney AJ., 1979.; Perry, 1977.).

### **1.4.2. OKSIDATIVNA HIPOTEZA**

U fiziološkim uvjetima, nusprodukt metabolizma stanice su nestabilne, potencijalno citotoksične molekule znane kao slobodni radikali ili reaktivni oblici kisika (ROS, od eng. *reactive oxygen species*). Zbog nesparenog elektrona kojeg posjeduju vrlo su reaktivne i stoga lako reagiraju s drugim molekulama u stanici. ROS uglavnom reagiraju s molekulama stanične membrane, DNA, proteinima ili ugljikohidratima koje se time strukturno i funkcionalno promijene što u konačnici narušava cjelokupnu funkciju stanice. Oštećenja stanica uzrokovana oksidacijskim stresom rezultat su poremećene ravnoteže stvaranja i neutraliziranja ROS. Stanice posjeduju antioksidativne enzime čija je zadaća neutralizirati nastale ROS i tako održati homeostazu. Hipoteza podrazumijeva nastanak neurodegenerativnih patoloških promjena pod utjecajem povišenih koncentracija ROS. Niže koncentracije antioksidacijskih enzima i velika potreba za kisikom čine mozak osjetljivijim na oštećenja uzrokovana ROS što ide u prilog hipotezi. Ta hipoteza dobro se upotpunjuje s hipotezom mitohondrijske kaskade i upalnom hipotezom jer povećane koncentracije ROS mogu nastati uslijed disfunkcije respiratornog lanca unutar mitohondrija, nakupljanja A $\beta$  koji dalje pokreće upalne reakcije i aktivaciju mikroglija stanica koje također proizvode ROS. Uz to, nakupine A $\beta$  mogu vezati metale koji potiču nastajanje vodikovog peroksida (Padurariu *i sur.*, 2013.).

### **1.4.3. HIPOTEZA MITOHONDRIJSKE KASKADE**

Ta hipoteza podrazumijeva da snižene stope oksidativne fosforilacije u mitohondrijima, povećano oslanjanje na anaerobnu glikolizu i visoka stopa proizvodnje ROS u konačnici dovode do histopatoloških promjena u AB. Znanstvenici predlažu da prekomjerna proizvodnja ROS u neuronima može poticati stvaranje A $\beta$  iz APP-a što nadalje dodatno reducira aktivnost enzima transportnog lanca elektrona. Osim toga, neravnoteža proizvodnje ROS i stope oksidativne fosforilacije, pokreće u neuronima proces apoptoze. Smatra se da je prekomjerna produkcija ROS u mitohondrijima i disfunkcija stanične energetike poveznica između hipoteze amiloidne kaskade i hipoteze mitohondrijske kaskade nastajanja sporadičnog oblika AB, ali na način da promijene metabolizma u mitohondrijima nastaju ranije i zatim uzrokuju daljnje promjene predložene hipotezom amiloidne kaskade (Swerdlow i Khan, 2004.).



#### **1.4.4. HIPOTEZA NASTANKA ALZHEIMEROVE BOLESTI USLIJED INFEKCIJE**

Hipoteza govori o mogućem utjecaju infekcije patogenima na nastanak AB. Također se usko veže uz upalnu hipotezu jer se djelovanje patogena na nastanak AB patologije odnosi na pokretanje upalnih procesa u CNS-u i na periferiji. Već je dugo poznato da patogeni mogu uzrokovati kronične progresivne bolesti CNS-a. Nekoliko patogena povezano je sa smanjenjem kognitivnih funkcija pa se smatra da bi mogli biti i uzrok nastanka AB. Najčešće se spominju *herpes simplex virus 1* (HSV-1), *Helicobacter pylori*, *Chlamydomphila pneumoniae* i *Borrelia burgdorferi*. Nakon infekcije, HSV-1 ostaje u latentnom stanju unutar živčanog tkiva, uglavnom uzrokuje pojavu herpesa na usnama ili u genitalnom području, ali može biti i uzrok nastanka encefalitisa. Neka istraživanja pokazuju da broj protutijela na HSV-1 u serumu raste sa starošću, da je umnažanje virusa u interakciji s produktima gena povezanih s nastankom AB (*PSEN1*, *PSEN2*, *APP* i *ApoE4*), a detektiran je i u tkivima oboljelih od AB *post mortem*. Pronađene su korelacije između AB i prisutnosti ostalih navedenih patogena u likvoru, serumu ili moždanom tkivu no važno je naglasiti da utjecaj patogena na nastanak AB ostaje upitan jer brojne studije nisu potvrdile navedene korelacije (Mawanda i Wallace, 2013.).

#### **1.4.5. UPALNA HIPOTEZA**

U mnogim slučajevima AB prisutni su biljezi kronične upale. Razine upalnih biljega povezane su s dimenzijom plakova. Također, upala u CNS-u učestalija je sa starenjem što može biti jedan od razloga pojave bolesti u kasnijoj životnoj dobi. Mikroglija stanice glavni su posrednici upalnih procesa CNS-a. Svojim nastavcima detektiraju potencijalnu opasnost nakon čega pokreću imunosni odgovor. Aktivirane mikroglija stanice nađene su u blizini plakova A $\beta$ . Hipoteza podrazumijeva da nakupljanje plakova i neurofibrilarnih snopića izaziva upalne procese. Iako su usmjereni na uklanjanje uzročnika upale i održavanje homeostaze, upalni procesi mogu postati nekontrolirani, te se kao posljedica javlja prekomjerna proizvodnja ROS i drugih upalnih medijatora što potiče daljnje napredovanje bolesti (Zotova *i sur.*, 2010.).

### **1.5. UPALA U SREDIŠNJEM ŽIVČANOM SUSTAVU**

Znanstvenici danas sa sigurnošću mogu opovrgnuti zastarjelo mišljenje da je živčani sustav izuzet od intervencija perifernog imunosnog sustava organizma i obrnuto, da živčani sustav nema utjecaj na periferni imunosni sustav. Poznati su neki od mehanizama njihove međusobne komunikacije, kako u fiziološki uobičajenom okruženju, tako i tijekom patoloških stanja. Komunikacija se ostvaruje putem autonomnog živčanog sustava, hormona, neuropeptida

i citokina. Takva povezanost važna je za bolje i lakše održavanje homeostaze (Rosa *i sur.*, 2014.).

Upale na periferiji mogu utjecati na aktivnost živčanog sustava, često izazivajući upale CNS-a, posebice ako je riječ o prolongiranim kroničnim sistemskim upalama. Upalni procesi u mozgu posljedično izazivaju opadanje kognitivnih sposobnosti kao rezultat odumiranja neurona, a teži oblici dovode i do pojave demencije. Svaka upala započinje lučenjem proupalnih citokina koji zatim reguliraju daljnji proces. Ulazak patogena ili ozljeda pokreću kaskadu lokalnih i sistemskih događaja. Jedan od glavnih proupalnih citokina je interleukin 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ). On pojačava proliferaciju T- i B-limfocita te inducira lučenje drugih važnih proupalnih citokina (TNF- $\alpha$ , IL-6). Citokini mogu ući u središnji živčani sustav u području cirkumventrikularnih organa, gdje je krvno-moždana barijera propusnija, mogu prijeći transportom posredovanim nosačima te u slučaju narušene krvno-moždane barijere. Osim direktnim djelovanjem u mozgu, citokini mogu djelovati i na aferentne neurone na periferiji (Rosa *i sur.*, 2014.). Najviše se proučavao IL-1. Osim što utječe na lučenja hormona iz hipotalamusa, ima i važnu ulogu kod upalnih procesa u mozgu. Receptori za IL-1 nađeni su u različitim regijama mozga, a za proučavanje negativnih utjecaja upale na kognitivne sposobnosti važno je spomenuti one u području hipokampusa (Cunningham i De Souza, 1993.). Kada glasnici upale dođu cirkulacijom do mozga mogu inducirati proizvodnju citokina u parenhimu mozga što rezultira daljnjim razvojem upalnih procesa. Također, zabilježeno je da blokiranje produkcije citokina na periferiji modulira imunski odgovor u središnjem živčanom sustavu (Jiang *i sur.*, 2008.).

Glavni akteri upale u CNS-u su mikroglia stanice. Buduće mikroglia stanice počinju ulaziti i „naseljavati“ središnji živčani sustav tijekom ranog embrionalnog razvitka, već od 4. tjedna gestacije (Ginhoux *i sur.*, 2013.). Njihova uloga je dvojaka: 1) zaštita mozga od patogena i 2) popravak moždanog tkiva nakon ozljede mozga. Međutim, mikroglia stanice mogu promijeniti uobičajeni obrazac aktivacije i time postaju štetne za okolne neurone (Barrientos *i sur.*, 2016.).

### **1.5.1. MIKROGLIJA STANICE**

Prva linija obrane u CNS-u su mikroglia stanice, mononuklearni fagociti koji pripadaju sustavu glija stanica u mozgu. Mikroglia stanice široko su rasprostranjene u moždanom tkivu, a čine 5-12% glija stanica u mozgu miševa (Lawson *i sur.*, 1990.), odnosno od 0,5% do 16,6% glija stanica kod čovjeka (Mittelbronn *i sur.*, 2001.). Za održavanje homeostaze u fiziološkim

uvjetima, ali i tijekom bolesti u CNS-u vrlo je bitno da mikroglia stanice zadrže adekvatnu funkciju i pravovremenu aktivaciju (Ginhoux *i sur.*, 2013.).

Mikroglia stanice tijekom razvoja nastaju iz mezodermalnog tkiva u žumanjčanoj vreći kod ljudi, a potom putuju krvotokom u CNS prije zatvaranja krvno-moždane barijere koja uslijedi nakon porođaja. Tamo proliferiraju i stvaraju mrežu stanica čija je zadaća održavanje homeostaze CNS-a (Ginhoux *i sur.*, 2010., 2013.). U fiziološkim uvjetima, mikroglia stanice su razgranate s dugim nastavcima kojima nadziru parenhim mozga. Prepoznaju širok spektar podražaja, autoimune reakcije, infekcije, ishemiju, toksične tvari i ozljede tkiva, a mogu i odstranjivati glutamatergičke sinapse. Takve štetne promjene u mozgu prepoznaju preko molekularnih medijatora kao što su glikolipidi, lipoproteini, nukleotidi, peptidi, strukturno promijenjeni ili agregirani proteini (npr. tau i A $\beta$  u AB), upalni citokini i oštećeni neuroni. Nakon stimulacije slijedi aktivacija mikroglia stanica tijekom koje se poveća tijelo stanice i promijene funkcionalna svojstva (von Bernhardt *i sur.*, 2015.).

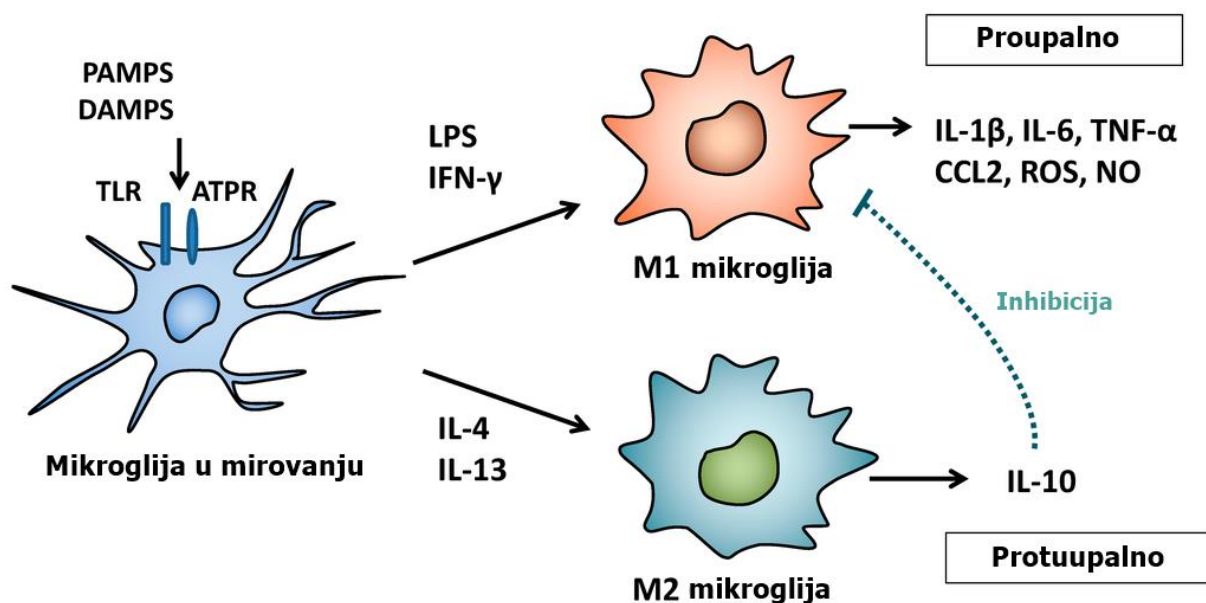
#### **1.5.1.1. FENOTIPOVI M1 I M2 MIKROGLIA STANICA**

U fiziološkim uvjetima imunski odgovor dobro je reguliran izmjenom procesa inicijacije upale i njenog razrješenja. Tijekom patoloških stanja može doći do nekontroliranog imunskog odgovora koji pozitivno korelira s disfunkcijom i gubitkom stanica tijekom procesa upale. Ovisno o okruženju u kojem se nalaze i podražaju kojim su stimulirane, mikroglia stanice podliježu različitim aktivacijskim uzorcima. Mogu se naći u stanju „klasične aktivacije“, „alternativne aktivacije“ ili „stečene deaktivacije“. Najčešće se koristi podjela na M1 ili proupalni fenotip i M2 regulatorni ili neuroprotektivni fenotip kojem je svrha „utišati“ upalne procese posredovane fenotipom M1 (Slika 3.). Ovisno o fenotipu koji se javi, različita je produkcija citokina i izražaj receptora na površini stanica, a to prati i promjena morfologije stanica, od razgranatih s dugim nastavcima tijekom mirovanja do ameboidnih tijekom aktivacije (Tang i Le, 2016.).

Tijekom „klasične aktivacije“ diferencira se fenotip M1. On je karakteriziran produkcijom proupalnih citokina (npr. faktor tumorske nekroze  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ , od eng. *tumor necrosis factor- $\alpha$* ), interleukin 1- $\beta$  (IL-1 $\beta$ )), dušikovog oksida (NO, od eng. *nitric oxide*), ROS i proteaza. Fenotip M1 aktivira se kao odgovor na ozljedu, infekciju ili druge abnormalne pojave, a uloga mu je obrana tkiva i uklanjanje patogena (Tang i Le, 2016.). Kao odgovor na citotoksične signale aktivira se regulatorni faktor interferona 5 (IRF5, od eng. *interferon-*

*regulatory factor 5*) koji dalje potiče transkripciju gena za proupalne citokine (TNF, IL-6, IL-12 i IL-23) (von Bernhardt *i sur.*, 2015.; Ouyang *i sur.*, 2007.).

Fenotip M2 uključen je u stanja „alternativne aktivacije“ i „stečene deaktivacije“. Alternativna aktivacija inducirana je citokinima IL-4 ili IL-13, a aktiviraju se geni koji promoviraju lučenje protuupalnih citokina, reparaciju tkiva i rekonstrukciju izvanstaničnog matriksa. Stečena deaktivacija je stanje koje također suprimira akutnu upalu, a inducirana je protuupalnim citokinima IL-10, transformirajućim faktorom rasta  $\beta$  (TGF- $\beta$ , od eng. *transforming growth factor- $\beta$* ) i apoptotskim stanicama. Te protuupalne faze javljaju se kao odgovor na upalne procese posredovane fenotipom M1 i zadaća im je popravak tkiva te povratak u homeostazu. Mikroglia stanice M2 u tu svrhu luče protuupalne citokine (IL-4, IL-13, IL-10, TGF- $\beta$ ). Također, povećan je izražaj receptora čistača u svrhu uklanjanja ostataka oštećenih stanica, a fenotip M2 povećava i lučenje neurotrofičnih faktora kao što je inzulinu sličan faktor rasta 1 (IGF-1, od eng. *insulin-like growth factor 1*) koji potiču obnovu i preživljavanje neurona (Tang i Le, 2016.).



**Slika 3.** M1 i M2 fenotipovi mikroglia stanica; preuzeto i prepravljeno iz: Nakagawa i Chiba, 2014.

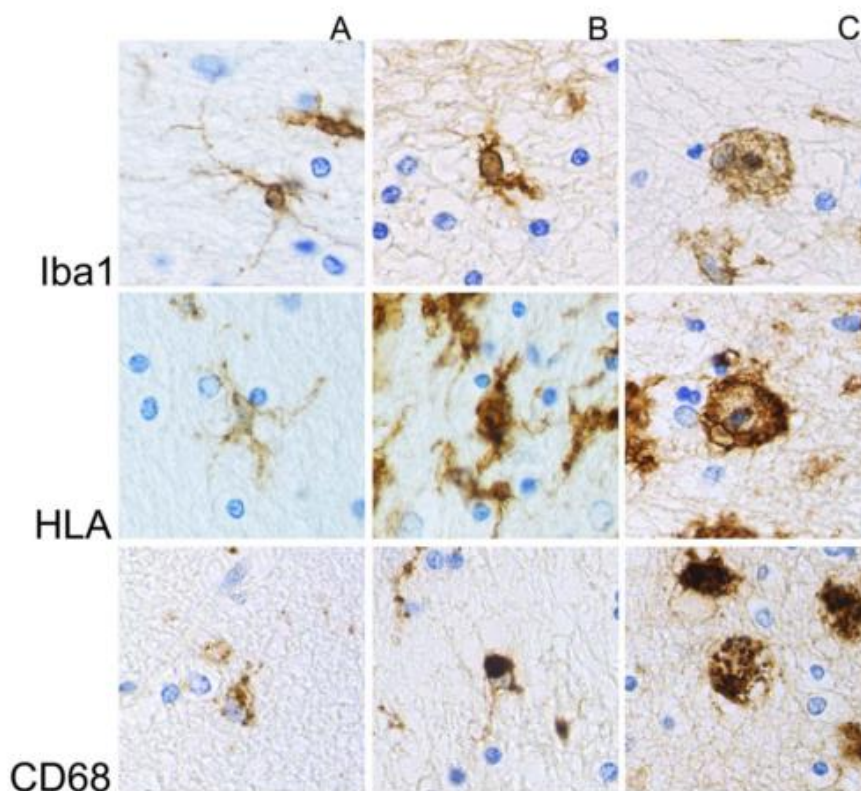
### 1.5.1.2. BILJEZI ZA ISTRAŽIVANJA MIKROGLIJA STANICA

Za istraživanje morfologije i aktivacije mikroglia stanica najčešće se koriste biljezi Iba1, CD68 i HLA-DR (Slika 4.).

Iba1 (od eng. *ionized calcium binding adaptor molecule 1*) je protein specifičan za mikroglia stanice i makrofage. Ključna je molekula u procesima fagocitoze i nabiranja membrane tijekom kojih kolokalizira s filamentima F-aktina (od eng. *filamentous actin*) koji omogućavaju stvaranje snopova aktina što ga čini važnim i za pokretljivost mikroglia stanica. Iba1 uključen je u signalne puteve kalcija i Rac fosfataze koja je ključna molekula regulacije reorganizacije aktina u nabiranju membrane (Ohsawa *i sur.*, 2004.). Biljeg Iba1 označava mikroglia stanice u fazi mirovanja i u početnoj fazi aktivacije. Također, upotrebom tog biljega dobro je vidljiva morfologija stanice, posebice dugi razgranati nastavci (Taipa *i sur.*, 2017.).

CD68 (od eng. *cluster of differentiation*) transmembranski je glikoprotein dominantno izražen na stanicama monocitne linije. Pripada skupini receptora čistača, a kod mikroglia stanica je uglavnom izražen na fagocitnim lizosomima, te u manjoj mjeri i na membrani stanice (Hendrickx *i sur.*, 2017.). Imunohistokemijskim bojanjem biljekom CD68 prikazuju se razgranate mikroglia stanice u mirovanju, a posebice aktivirane ameboidne s fagocitnom aktivnošću (Bachstetter *i sur.*, 2015.).

HLA-DR (od eng. *human leukocyte antigen*) je receptor na površini stanica iz skupine MCH-II (od eng. *major histocompatibility complex*), odnosno molekula glavnog kompleksa tkivne podudarnosti. Glavna zadaća mu je prezentiranje antigena stanicama imunskog sustava što je bitno za raspoznavanje vlastitih od stranih antigena. Zbog uključenosti u imunosne reakcije smatra se da je njegov izražaj povećan na stanicama koje sudjeluju u upali (Minett *i sur.*, 2016.). Zbog izloženosti receptora na površini stanica morfologija mikroglia stanica dobro je vidljiva nakon obilježavanja biljekom HLA-DR. Mikroglia stanice povećavaju izražaj HLA-DR kao odgovor na različita patološka stanja i stimulaciju proupalnim citokinima. Iz navedenih razloga biljeg HLA-DR dobar je izbor za proučavanje aktiviranih mikroglia stanica (Hendrickx *i sur.*, 2017.).



**Slika 4.** Izražaj biljega HLA-DR, Iba1 i CD68 kod različitih fenotipova mikroglia stanica; A) razgranate B) ameboidne stanice i C) pjenasti makrofazi preuzeto iz: Hendrickx *i sur.*, 2017.

Studija koja je objedinila većinu do tada objavljenih radova o izražaju biljega mikroglia stanica u AB, navodi da većina radova pokazuje veći izražaj biljega HLA-DR u AB nego u kontrolama, te da izražaj tog biljega raste s progresijom bolesti. Također, od 21 studije koje su istraživale izražaj biljega CD68, 17 ih je pokazalo veći izražaj biljega u AB u odnosu na kontrole, a četiri studije nisu pokazale značajniju razliku između oboljelih od AB i kontrola. Navedena istraživanja provedena su u različitim regijama mozga, a od osam studija koje su proučavale izražaj biljega u hipokampusu, šest je zabilježilo veći izražaj u AB u odnosu na kontrole dok u ostale dvije nije bilo razlike. Studije o izražaju biljega Iba1 ipak sadrže različite rezultate. Desetak studija pokazalo je porast izražaja biljega u AB, deset ih nije pokazalo razliku između oboljelih od AB i kontrola dok je čak pet studija pokazalo smanjen izražaj biljega Iba1 u AB u odnosu na kontrole. Studije koje su istraživale izražaj biljega u hipokampusu daju slične rezultate. U tri je zabilježen veći izražaj u AB, u pet nije bilo razlike i u jednoj je izražaj biljega Iba1 manji u AB nego u kontrola (Hopperton *i sur.*, 2017.).

Jedno istraživanje izražaja HLA-DR pokazalo je porast izražaja biljega s progresijom bolesti u sloju zrnatih stanica nazubljene vijuge (GD, *gyrus dentatus*) i CA1 polju hipokampusa s time da je izražaj bio mnogo značajniji u CA1 sloju (Xiang *i sur.*, 2006.). Veći izražaj biljega

CD68 i HLA-DR zabilježen je u oboljelih od AB ali i u starijih kontrola, dok kontrolni uzorci mlađih mozgova nisu pokazali izražaj tog biljega. Navedena studija pokazala je i povećani izražaj CD68 i HLA-DR u uzorcima ljudi koji nisu imali AB ali su pretrpjeli neki oblik sistemske upale (Tischer *i sur.*, 2016.). Istraživanje izražaja biljega CD68 pokazuje povećani izražaj u subikulumu i CA1 polju hipokampusa kod uzoraka bolesnika s AB u usporedbi s kontrolama (Taipa *i sur.*, 2017.). U osoba koje nisu oboljele od AB a imale su slabije kognitivne sposobnosti primijećen je veći izražaj biljega CD68 i HLA-DR, dok je kod osoba s boljim kognitivnim sposobnostima bio povećan izražaj biljega Iba1, a smanjen izražaj CD68. U istoj studiji izražaj svih biljega pozitivno je korelirao s patološkim promjenama u AB. Također je zabilježen porast izražaja HLA-DR i CD68 kod osoba s alelom  $\epsilon 4$  gena *APOE* koji je povezan s većim rizikom za obolijevanje od AB. Kod tih osoba također je primijećen smanjen izražaj Iba1, dok je kod onih s alelom  $\epsilon 2$  zamijećen porast izražaja Iba1 i smanjenje izraženosti biljega CD68 i HLA-DR (Minett *i sur.*, 2016.).

### **1.5.1.3. PROMJENE MIKROGLIJA STANICA TIJEKOM STARENJA**

Starenje organizma za sobom povlači brojne strukturne i funkcionalne promjene. Istraživanja su pokazala opadanje moždane mase sa starenjem. Smatra se da se masa smanjuje za 2-3% za svako desetljeće nakon pedesete godine. Kompleksne kognitivne funkcije progresivno opadaju tijekom starenja (Drachman, 2006.).

Na staničnoj razini događa se niz uzročno-posljedičnih procesa izazvanih starenjem. Karakteristike starenja su skraćivanje telomera, aktivacija tumorsupresorskih gena, akumulacija oštećenja DNA, oksidacijski stres i umjereni kronični upalni procesi. Tijekom starenja tkivo mozga pokazuje neravnotežu između razina pro- i protuupalnih citokina. Dodatno, potencijalno štetni medijatori, citokini, radikali i drugi, nastaju kao odgovor na izlaganje fizičkim, biološkim i kemijskim agensima od kojih se mnogi akumuliraju godinama. To mogu biti, ionizirajuće zračenje, patogeni, polutanti i dr. Primijećene su smanjene razine regulatornog IL-10 dok su razine proupalnih citokina TNF $\alpha$  i IL-1 $\beta$  povišene u plazmi, a IL-6 u CNS-u. Nadalje, kao posljedica starenja javljaju se snažnije sistemske upale, te povećana propusnost krvno moždane barijere (BBB, eng.*blood-brain barrier*) (von Bernhardt *i sur.*, 2015.).

Starenjem se smanjuje ekspresija proteina kladin-5 i okcludina, koji su sastavni dio čvrstih spojeva među stanicama. Povećana propusnost BBB olakšava ulazak brojnih komponenti plazme koji tako ulaze u začarani krug daljnje indukcije upale. Osim imunskih stanica koje u ovom slučaju lakše dopijevaju u mozak, olakšan je i prolaz imunoglobulina (Ig). IgG je potencijalni stimulans aktivacije mikroglija stanica, preko Fc $\gamma$  receptora. Starenje samo, a posebice u kombinaciji s pretišću povećava izražaj Fc $\gamma$  receptora na mikroglija stanicama u hipokampalnom području. To su samo neki od razloga da je aktivacija mikroglija stanica puno snažnija tijekom starenja, a njihova jača aktivacija štetno utječe na daljnji integritet BBB (Tucsek *i sur.*, 2014.) jer tada mikroglija stanice signaliziraju astrocitima da povećaju propusnost BBB.

Tijekom starenja vidljive su brojne promjene mikroglija stanica. Iako se mnoge od tih promjena zamjećuju i kod neurodegenerativnih bolesti, važno je naglasiti da neurodegenerativne bolesti nisu normalna posljedica starenja i opadanja kognitivnih sposobnosti povezanih sa starenjem, nego su oboje složena multifaktorijska stanja od kojih su mnogi faktori zajednički (von Bernhardt *i sur.*, 2015.). Starenjem se mijenja ekspresija gena, posebno su zahvaćeni geni koji kodiraju za površinske receptore. Vidljiv je povećani izražaj TLR (od eng. *Toll-like receptors*) i TLR4 koreceptora CD14. Promijenjen je i prijenos signala TLR4 te izražaj receptora čistača (SR, od eng. *scavenger receptors*). TLR, CD14 i SR ključni su receptori u obrani od patogena i uklanjanju oštećenih neurona jer prepoznaju molekularne uzorke patogena (PAMP, od eng. *pathogen-associated molecules pattern*) te molekularne uzorke povezane s oštećenjima (DAMP, od eng. *damage-associated molecules pattern*). Aktiviranje tih receptora rezultira aktivacijom mikroglija stanica, produkcijom proupalnih citokina i uklanjanjem patogena. Stoga promjene izražaja receptora za posljedicu imaju promjenu u aktivaciji stanica (Letiembre *i sur.*, 2007.). Važnu ulogu u regulaciji odgovora mikroglija stanica imaju i neke molekule izražene na površini neurona. Dokazani su proteini koji aktiviraju protuupalne signale nakon interakcija s receptorima. Dva takva proteina, CD200 i fraktalkin (CX3CL1), koji su uglavnom izraženi na neuronima, djeluju na inhibiciju mikroglija stanica preko receptora (CD200R i CX3CR1) koji su izraženi na njima. Istraživanja su pokazala da mladi odrasli CD200 *knockout* miševi imaju kronično aktivirane mikroglija stanice, fenotip sličan onome kod starijih životinja (Hoek *i sur.*, 2000.). Nađene su i smanjenje razine CD200 proteina i smanjen izražaj gena za taj protein u hipokampalnom tkivu starijih životinja. To su dokazi koji govore da kontrola inhibicije proupalnih procesa kod mikroglija stanica može biti ugrožena starenjem, čime je



stariji mozak predisponiran za prekomjerne proupalne odgovore u slučaju imunskih intervencija (Barrientos *i sur.*, 2016.).

Oštećeni dijelovi stanice uklanjaju se autofagijom. Tijekom starenja efikasnost autofagije opada, a rezultat je nakupljanje otpadnih materijala u stanici, npr. oštećenih mitohondrija koji proizvode još više ROS. Mikroglia stanice izuzete iz starijih mozгова pokazuju povećanu bazalnu produkciju IL-6 i povećani IL-1 $\beta$  i IL-6 nakon stimulacije lipopolisaharidom (LPS) u usporedbi s kulturama mikroglia stanica iz mladih mozgov (Ye i Johnson, 1999.). U starijim mozgovima, manje ozljede koje se inače lako saniraju, mogu izazvati oštećenja i inicirati razvoj bolesti (von Bernhardi *i sur.*, 2015.). Istraživanje na mladim i štakorima srednje dobi u stanju kronične sistemske upale pokazuju da takvo stanje potiče starenje mikroglia stanica već od srednje životne dobi. Starenje mikroglia stanica izazvalo je smanjenu dugotrajnu potencijaciju (LTP) u hipokampusu samo kod štakora srednje dobi. Ti rezultati pokazuju da kronična sistemska upala može inducirati smanjenje sposobnosti učenja i pamćenja utjecajem na starenje mikroglia stanica (Liu *i sur.*, 2012.).

Starije mikroglia stanice pokazuju morfološke promjene, a karakteriziraju ih manji i kraći izdanci, povećan volumen tijela stanice i formiranje sferoidnih izbočina. Osim morfoloških promjena, zabilježene su promjene u dinamičnom odgovoru mikroglia stanica na ozljedu. Mlade mikroglia stanice povećaju svoju mobilnost i brzo izdužuju izdanke kada su izložene signalu ozljede. Nasuprot tome, starije mikroglia stanice su manje razgranate i dinamične, i štoviše, dodatno im se smanjuje dinamičnost pri izloženosti signalu ozljede. Kako stanice stare, njihova deagregacija s mjesta ozljede sve je sporija što govori da starije mikroglia stanice imaju tendenciju neprekidno djelovati. Kako učestalost neurodegenerativnih bolesti raste sa starenjem, navedene promjene mogle bi biti jedan od okidača za njihov nastanak (von Bernhardi *i sur.*, 2015.).

### **1.5.2. UPALA U ALZHEIMEROVOJ BOLESTI**

Upala u CNS-u zajedničko je svojstvo mnogih neurodegenerativnih bolesti kao što su na primjer Parkinsonova bolest, amiotrofična lateralna skleroza i Alzheimerova bolest. Više istraživanja potvrdilo je povećanu aktivaciju mikroglia stanica i koncentraciju upalnih medijatora tijekom patogeneze neurodegenerativnih bolesti (Tang i Le, 2016.).

Uglavnom se smatra da je upala u CNS-u posljedica nakupina abnormalnih proteina u AB. Nakupljanje plakova A $\beta$  aktivira mikroglia stanice i stimulira proizvodnju potencijalno toksičnih medijatora: NO, ROS, proupalnih citokina i proteolitičkih enzima

(Maezawa *i sur.*, 2011.; Zotova *i sur.*, 2010.). Pokazano je i da oligomerne nakupine A $\beta$  jače aktiviraju mikroglia stanice u usporedbi s fibrilarnim nakupinama, tj. da induciraju diferencijaciju fenotipa M1 (Michelucci *i sur.*, 2009.). Aktivirane mikroglia stanice uočene su i u blizini neurona s NFS, a abnormalne nakupine proteina tau mogu se otpuštati i u izvanstanični prostor što ih također aktivira. Istraživanja pokazuju bolju korelaciju aktiviranih mikroglia stanica s NFS nego s plakovima A $\beta$ , te ona prati tijek kliničke progresije bolesti (Serrano-Pozo *i sur.*, 2011.). Postoje i dokazi da aktivirane mikroglia stanice mogu poticati hiperfosforilaciju proteina tau. Proupalni citokini (IL-1, IL-6 i TNF- $\alpha$ ) i fraktalkin mogu modificirati fosforilaciju i time utjecati na strukturu i funkciju proteina tau, te tako pojačana aktivacija mikroglia stanica, zbog disfunkcije receptora za fraktalkin može ubrzati nastajanje NFS (Tang i Le, 2016.).

Komponente komplementa detektirane su u plakovima i u neuronima na koje su vezani imunoglobulini. Također, prisutnost komponenti komplementa visoko korelira s gubitkom neurona pa se smatra da neurodegeneracija može biti posredovana klasičnim putem aktivacije komplementa (D'Andrea, 2005.; Sardi *i sur.*, 2011.).

Narušavanje BBB također može doprinijeti progresiji imunskih reakcija u mozgu. Integritet BBB može biti narušen uslijed patoloških promjena na krvnim žilama mozga, višestrukih trauma i upale. Posljedice narušene BBB su veći priljev imunskih stanica s periferije koje mogu pojačati imunsku reakciju u mozgu i prodor A $\beta$  iz cirkulacije uz njegovo dodatno nakupljanje. T-limfociti mogu prolaziti kroz BBB, ali u fiziološkim uvjetima nisu brojni u mozgu. Njihova brojnost u mozgu raste narušavanjem integriteta BBB ali i zbog povećanog izražaja MHC-II (od eng. *major histocompatibility complex*) molekula na površini aktiviranih mikroglia stanica (Sardi *i sur.*, 2011.).

Pretpostavke o ulozi upalnih procesa u AB mogu se potkrijepiti spoznajom o polimorfizmima gena uključenih u regulaciju upale. Polimorfizmi gena za proupalne citokine mogu biti povezani sa stupnjem aktivacije mikroglia stanica u AB, a povećana aktivacija pronađena je i kod nosioca alela  $\epsilon 4$  gena *APOE* (Zotova *i sur.*, 2010.). Na kromosomu 6 kod ljudi nalazi se gen za TREM2 (od eng. *triggering receptor expressed on myeloid cells 2*) koji je visoko eksprimiran u mozgu, nalazi se isključivo na površini mikroglia stanica i regulira procese aktivacije, fagocitoze i preživljavanja stanica. Poznate su varijante tog gena koje povećavaju rizik od nastanka AB (Yeh *i sur.*, 2017.).

Kada se uzmu u obzir sve navedene promjene posredovane upalnim procesima može se zaključiti da neadekvatna funkcija mikroglia stanica, tj. nemogućnost prelaska iz stanja „klasične aktivacije“ u stanje „alternativne aktivacije“ može predstavljati značajan okidač razvoja štetnih posljedica upale u neurodegenerativnim bolestima (Zotova *i sur.*, 2010.).

### **1.5.3. STRATEGIJE ZA KONTROLU UPALE U ALZHEIMEROVOJ BOLESTI**

Učinkovito liječenje koje se temelji na kontroli upale u CNS-u trebalo bi ciljati na regulaciju odgovora mikroglia stanica. Štetan učinak mikroglia stanice jednim dijelom ostvaruju prekomjernom produkcijom ROS-a, pa je enzimski kompleks NADPH oksidaze potencijalno dobra meta za tretman. Pokazano je da neki peptidi i male molekule mogu inhibirati NADPH oksidazu s mogućim neuroprotektivnim učincima. Također, brojni upalni citokini mogu biti potencijalni ciljevi terapija. Loša strana blokiranja upalnih citokina je imunosupresija imunskih stanica na periferiji. Tako djeluje minociklin, koji može normalizirati razine IL-1 $\beta$ . S druge strane, pokazalo se da njegovo djelovanje uvelike ovisi o dobi ispitivane životinje. Inhibicija mikroglia stanica može biti povoljna u nekom stadiju progresije bolesti, dok u drugim fazama postaje štetna. Smanjenje ROS i oksidacijskog stresa može se postići i aktivacijom antioksidativnih puteva. Redoks regulirana hem oksigenaza 1 (HO-1) predstavlja zaštitni sistem protiv oksidacijskog stresa. Istraživanja pokazuju da aktivirani fraktalkin u mikroglia stanicama regulira transkripcijski faktor NRF2 (od eng. *nuclear factor erythroid 2-related factor 2*) i njegove ciljane gene, uključujući *HO-1*. Potvrđeno je da NRF2 i fraktalkin receptor *knockout* miševi nisu eksprimirali *HO-1* u mikroglia stanicama i da NRF2 indukcija *HO-1* može ograničiti prekomjernu aktivaciju mikroglia stanica. Osim toga, nedostatak HO-1 korelira s povećanim razinama glutamata i neurotoksičnosti. Na temelju tih saznanja, modulacija ekspresije *HO-1* predstavlja velik potencijal za liječenje ili usporavanje napredovanja neurodegenerativnih poremećaja (von Bernhardt *i sur.*, 2015.).

Bolesnici koji su dulje vrijeme koristili nesteroidne protuupalne lijekove (NSAID, od eng. *non-steroidal anti-inflammatory drugs*) imali su manju pojavnost AB (Bas *i sur.*, 2001.; Zandi *i sur.*, 2002.). Hipoteza o povoljnom utjecaju NSAID na sprječavanje razvoja

AB testirana je i na eksperimentalnim životinjama kod kojih se pokazalo smanjenje ili prevencija patoloških promjena u AB. Kako je uklanjanje plakova A $\beta$  u AB smanjeno, drugi pristup liječenju je usmjeravanje imunosne reakcije prema plakovima čime se pospješuje njihovo uklanjanje. Iako se u životinjama ta vrsta terapije pokazala uspješnom u prevenciji nastajanja i boljem uklanjanju plakova i distrofičnih neurona, rezultati kod ljudi su proturječni. Kod nekih se pokazalo učinkovitije uklanjanje plakova, ali to nije utjecalo na sprječavanje progresije bolesti (Zotova *i sur.*, 2010.).

## 2. CILJEVI

S obzirom na poznatu ulogu upale u neurodegenerativnim bolestima i pretpostavke o štetnom utjecaju pretjerane aktivacije mikroglia stanica u AB, ciljevi ovog istraživanja bili su:

- Ispitati izraženost biljega mikroglia stanica Iba1, CD68 i HLA-DR u područjima hipokampalne formacije (sloj zrnatih stanica nazubljene vijuge, hilus, CA3/2, CA1, subikul, bijela tvar) osoba oboljelih od AB i kontrolnih uzoraka
- Ustanoviti postoji li pozitivna korelacija izražaja biljega Iba1, CD68 i HLA-DR s duljinom trajanja AB
- Usporediti izražaj biljega aktivirane mikroglie, CD68 i HLA-DR s brojem amiloidnih plakova i NFS u područjima hipokampalne formacije

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. MATERIJALI

##### *Uzorci moždanog tkiva*

Kao materijal u istraživanju korišteni su uzorci tkiva medijalnog dijela sljepoočnog režnja dobiveni post mortem od šest osoba s Alzheimerovom bolešću i šest kontrolnih uzoraka iz zbirke Huddinge Brain Bank, Karolinska Institute, Stockholm, Švedska. Moždano tkivo prikupljeno je i korišteno u skladu s propisanim etičkim pravilima i uz odobrenje etičkog povjerenstva. Uzorci AB dobiveni su od osoba kojima je za života klinički dijagnosticirana Alzheimerova bolest, a neuropatološkom analizom *post mortem*, potvrđena dijagnoza pomoću CERAD (od eng. *Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease*) kriterija (Mirra *i sur.*, 1991.). Kao kontrolni uzorci korišteni su rezovi šest osoba usporedivih po dobi i spolu s osobama s AB, koje za života nisu bolovale od neuroloških ili psihijatrijskih poremećaja niti je uzrok smrti bio povezan s nekim od navedenih poremećaja ili traumom glave (Tablica 1.). Pod lupom nakon obdukcije medijalni dijelovi sljepoočnog režnja izrezani su u blokove koji su sadržavali hipokampalnu formaciju, entorinalnu moždanu koru i dio sljepoočne moždane kore. Blokovi su izrezani u frontalnoj ravnini na debljinu od 3 mm paralelno jedan u odnosu na drugi, a u rostrokaudalnom smjeru okomito na septotemporalnu osovinu. Zatim su uklopljeni u parafinske blokove kako je opisano u radu Westa i Gundersena (West i Gundersen, 1990.). Za daljnju analizu od hipokampalnog tkiva uklopljenog u parafinske blokove napravljeni su rezovi debljine 12  $\mu\text{m}$ . U istraživanju su korišteni slučajni rezovi različitih razina hipokampusa i uspoređivani su na istoj ili približno istoj razini reza patološkog i kontrolnog tkiva.

**Tablica1.** Podaci o uzorcima korištenim u istraživanju

KONTROLNI UZORCI		UZORCI ZAHVAĆENI ALZHEIMEROVOM BOLEŠĆU		
Dob (godine)	Spol	Dob (godine)	Spol	Trajanje bolesti (godine)
84	Ž	80	Ž	6
68	M	73	M	7
77	Ž	80	Ž	5
85	Ž	84	Ž	3,5
62	Ž	73	Ž	4
75	M	77	M	3,5

*Imunohistokemijski biljezi*

Za vizualizaciju aktiviranih mikroglija stanica u slojevima hipokampalne regije korištena su tri različita protutijela:

- Iba1 (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., kataloški broj 019-19741)
- CD68 (Dako, kataloški broj M0814)
- HLA-DR (Dako, kataloški broj M0775)

## 3.2. METODE

### *Imunohistokemijsko bojanje*

Kako bi se vizualizirala aktivacija mikroglija stanica u pojedinim slojevima hipokampusa uzorci moždanog tkiva osoba s Alzheimerovom bolešću i kontrolni uzorci podvrgnuti su imunohistokemijskom bojanju biljezima za aktivirane mikroglija stanice Iba1, CD68 i HLA-DR.

Prije početka imunohistokemijskog bojenja preparati tkiva mozga su deparafinizirani serijom ispiranja ksilolom i rehidrirani etanolom u nizu padajućih koncentracija (apsolutni etanol, 96%-tni etanol, 70%-tni etanol). Nakon deparafinizacije i rehidracije preparati su isprani PBS-om (od engl. *phosphate buffered saline*, pH=7,4) a otvaranje epitopa antigena koje prepoznaje protutijelo (eng. *antigen retrieval*) izvršeno je kuhanjem u citratnom puferu (pH=6,0).

Endogene peroksidaze inaktivirane su predtretmanom metanolom i 0,3%-tnim vodikovim peroksidom. Nakon daljnjeg ispiranja PBS-om uslijedilo je blokiranje nespecifičnog vezanja protutijela.

Blokiranje je postupak kojim se sprječava pojava lažno pozitivnog obojenja zbog nespecifičnog vezanja protutijela. Za blokiranje se koriste serumi životinja ili otopine proteina koji tvore tanak sloj na površini tkiva i time sprječavaju nespecifično vezanje protutijela. Preparati se prije nakapavanja otopine za blokiranje okruže tankim slojem hidrofobne tekućine (*PAP pen*, Sigma Aldrich) koja predstavlja barijeru za istjecanje nakapane otopine. Preparati koji su tretirani primarnim protutijelom za biljeg Iba1, proizvedenim iz zečjeg seruma, blokirani su otopinom koja sadrži 10%-tni NGS (od engl. *normal goat serum*) u 0,5%-tnom Triton/PBS. Otopina za blokiranje preparata koji su tretirani primarnim protutijelima za biljege CD68 i HLA-DR, proizvedenim iz mišjeg seruma, sadrži 5%-tnu otopinu BSA (od engl. *bovine serum albumin*) u 0,5%-tnom Triton/PBS. Blokiranje je provedeno kroz 60min na sobnoj temperaturi u vlažnoj komori.

Primarna protutijela za CD68 i HLA-DR proizvedena iz mišjeg seruma razrijeđena su u 5%-tnoj BSA otopini za blokiranje u omjerima CD68 1:1250 i HLA-DR 1:300. Primarno protutijelo za Iba1 proizvedeno iz zečjeg seruma razrijeđeno je u 10%-tnoj NGS otopini za blokiranje u omjeru 1:250. Nakon uklanjanja otopine za blokiranje, rezovi su prekriveni razrijeđenim protutijelima i inkubirani preko noći na 4°C nakon čega je uslijedilo ispiranje



PBS-om. Za kontrolu bojanja za svaki od navedenih biljega uzet je dodatni tkivni uzorak koji nije tretiran primarnim protutijelom, takozvana negativna kontrola, odnosno kontrola specifičnosti vezanja primarnog protutijela.

Sekundarna protutijela razrijeđena su u dvostruko razrijeđenoj otopini za blokiranje. Sekundarno protutijelo *anti-mouse* (Vectastain® ABC kit, kataloški broj PK-4002) korišteno za primarna protutijela CD68 i HLA-DR razrijeđeno je u omjeru 1:200, a sekundarno protutijelo *anti-rabbit* (Vectastain® ABC kit, kataloški broj PK-4001) korišteno za primarno protutijelo Iba1 razrijeđeno je u omjeru 1:200. Tako razrijeđena sekundarna protutijela nakapana su na sve rezove uključujući i negativnu kontrolu. Inkubacija preparata provedena je u vlažnoj komori kroz 60 min nakon čega je uslijedilo ispiranje PBS-om.

Tercijarno protutijelo također se priprema u dvostruko razrijeđenim otopinama za blokiranje, kao i sekundarno. Tercijarno protutijelo za biljege CD68 i HLA-DR (Vectastain® ABC kit, kataloški broj PK-4002) u 2,5% BSA u omjeru 10:2000, dok je tercijarno protutijelo za biljeg Iba1 (Vectastain® ABC kit, kataloški broj PK-4001) pripremljeno u istom omjeru, ali u 5%-tnoj NGS otopini za blokiranje. Preparati su inkubirani u vlažnoj komori 60 min nakon čega je uslijedilo ispiranje PBS-om.

Vizualizacija je provedena otopinom koja sadrži diaminobenzidin (3,3'-Diaminobenzidin, DAB) (SIGMAFAST™ DAB *with Metal Enhancer Tablet Set*, kataloški broj D 0426), a pripremljena je prema uputama proizvođača. Preparati su nakapani otopinom za vizualizaciju i inkubirani na sobnoj temperaturi. Uzorci tretirani protutijelima za biljege CD68 i HLA-DR te negativne kontrole istih biljega, razvijani su 10 min, dok su uzorci tretirani protutijelom za biljeg Iba1 i negativna kontrola razvijani 8 min. Uslijedilo je ispiranje u PBS-u i zatim u destiliranoj vodi.

Nakon sušenja stakalca su prebačena u kadicu s Histoclear-om. Rezovi su prekriveni kapljicom Histomounta (Poly-Mount®, kataloški broj 08381-120) i pokrovnim stakalcem.

#### *Bojanje metodom po Nisslu*

Bojanje metodom po Nisslu koristi se za lakšu orijentaciju i određivanje područja hipokampalne formacije. Nakon postupka deparafinizacije koji je prethodno opisan, uzorci se tretiraju 0,5%-tnom otopinom krezil-violeta razrijeđenoj u destiliranoj vodi u omjeru 1:4. Ovisno o izgledu preparata, uzorci se tretiraju otprilike 3-4 min. Uslijedilo je ispiranje

destiliranom vodom, a nakon toga 70%-tnim etanolom. Uzorci se zatim ispiru u kiselom alkoholu (70%-tni etanol u koji se doda nekoliko kapi 10%-tne octene kiseline). Slijedi ispiranje u 70%-tnom i 96%-tnom etanolu te se uzorci pročiste u 100%-tnom etanolu i ksilolu. Nakon sušenja, rezovi se prekriju kapljicom Histomounta i pokrovnim stakalcem.

### *Svjetlosna mikroskopija*

Mikroskopiranje i semikvantitativna analiza uzoraka napravljena je pomoću mikroskopa Nikon YS2-H Alphaphot-2, a fotografije preparata napravljene su digitalnom kamerom Nikon DXM 1200 uz pomoć programa Nikon ACT-1.

### *Semikvantifikacija*

Imunoreaktivnost kvantificirana je prema skali:

0 = imunoreaktivnost nije prisutna

1 = prisutno je nekoliko imunoreaktivnih stanica, sve stanice su razgranate

2 = umjeren broj imunoreaktivnih stanica, uglavnom su razgranate, manji broj aktiviranih

3 = mnogo difuzno raspoređenih imunoreaktivnih stanica, sve su aktivirane

4 = mnogo velikih nakupina aktiviranih mikroglija stanica

Područja hipokampalne formacije (nazubljena vijuga (GD), hilus, CA2/3, CA1, subikulum (SUB) i bijela tvar) određena su prema radu Westa i Gundersena (West i Gundersen, 1990.).

## 4. REZULTATI

### 4.1. Izraženost biljega Iba1

Imunohistokemijskim bojanjem analizirana je izraženost biljega Iba1. Protein Iba1 ključan je u procesima fagocitoze i nabiranja membrane (Ohsawa *i sur.*, 2004.). Taj biljeg označava mikroglia stanice u mirovanju i u početnoj fazi aktivacije, a njegovom upotrebom dobro je vidljiva morfologija stanice, posebice dugi razgranati nastavci (Taipa *i sur.*, 2017.).

Izraženost biljega Iba1 prikazana je u Tablici 2. Od šest testiranih parova uzoraka AB i kontrola kod četiri je bila vidljiva veća izraženost biljega u kontrolnim uzorcima dok je u preostala dva para izraženost Iba1 veća u uzorcima hipokampusa osoba s AB. Ako se promatra prosječna izraženost biljega može se zaključiti da je prisutnost biljega Iba1 sveukupno bila manja u uzorcima dobivenima od osoba oboljelih od AB. Među uzorcima AB, Iba1 je bio najviše izražen u bijeloj tvari i CA1 polju. Područja s najmanjom prisutnošću toga biljega bila su GD i hilus fascije dentate. S druge strane, prosječna izraženost biljega Iba1 bila je povećana u uzorcima osoba koje nisu oboljele od Alzheimerove bolesti. Ovdje je aktivnost Iba1 bila najviše prisutna u području hilusa i GD, potom u polju CA2/3, a najmanje u području bijele tvari.

Također smo primijetili i pozitivan trend prisutnosti biljega i duljine trajanja bolesti. U osoba s kraćim trajanjem bolesti (kraćim od 4 godine), uočena je manja izraženost Iba1 biljega, dok je povećana izraženost dokumentirana u uzorcima osoba s duljim trajanjem bolesti (trajanje bolesti dulje od 5 godina, Tablica 3. i Slika 5.). Kod kontrolnih uzoraka nije primijećena korelacija između prisutnosti biljega i dobi.

Biljeg Iba1 označava neaktivirane i mikroglie u početnoj fazi aktivacije pa je njegovom upotrebom dobro vidljiva morfologija razgranate mikroglie (Slika 6).

**Tablica 2.** Izražaj biljega Iba1 po područjima hipokampalne formacije kod uzoraka s AB i kontrolnih uzoraka\*

UZORAK (AB)			PODRUČJE HIPOKAMPALNE FORMACIJE					
DOB (godine)	SPOL	TRAJANJE AB (godine)	GD	HILUS	CA2/3	CA1	SUB.	BT
80	Ž	6	•	●	●	●	●	●
73	M	7	●	●	●	●	●	●
80	Ž	5	•	●	●	●	●	●
84	Ž	3,5	•	•	•	•	•	•
73	Ž	4	•	•	•	•	•	•
77	M	3,5	•	•	•	•	•	•
PROSJEČNA IZRAŽENOST Iba1 PO PODRUČJIMA			•	●	●	●	●	●

UZORAK (KONTROLA)		PODRUČJE HIPOKAMPALNE FORMACIJE					
DOB (godine)	SPOL	GD	HILUS	CA2/3	CA1	SUB.	BT
84	Ž	●	●	●	●	●	●
68	M	●	●	•	•	•	•
77	Ž	•	●	•	•	•	•
85	Ž	•	●	•	•	•	•
62	Ž	●	●	●	●	●	●
75	M	•	●	•	•	•	•
PROSJEČNA IZRAŽENOST Iba1 PO PODRUČJIMA		●	●	●	●	●	●

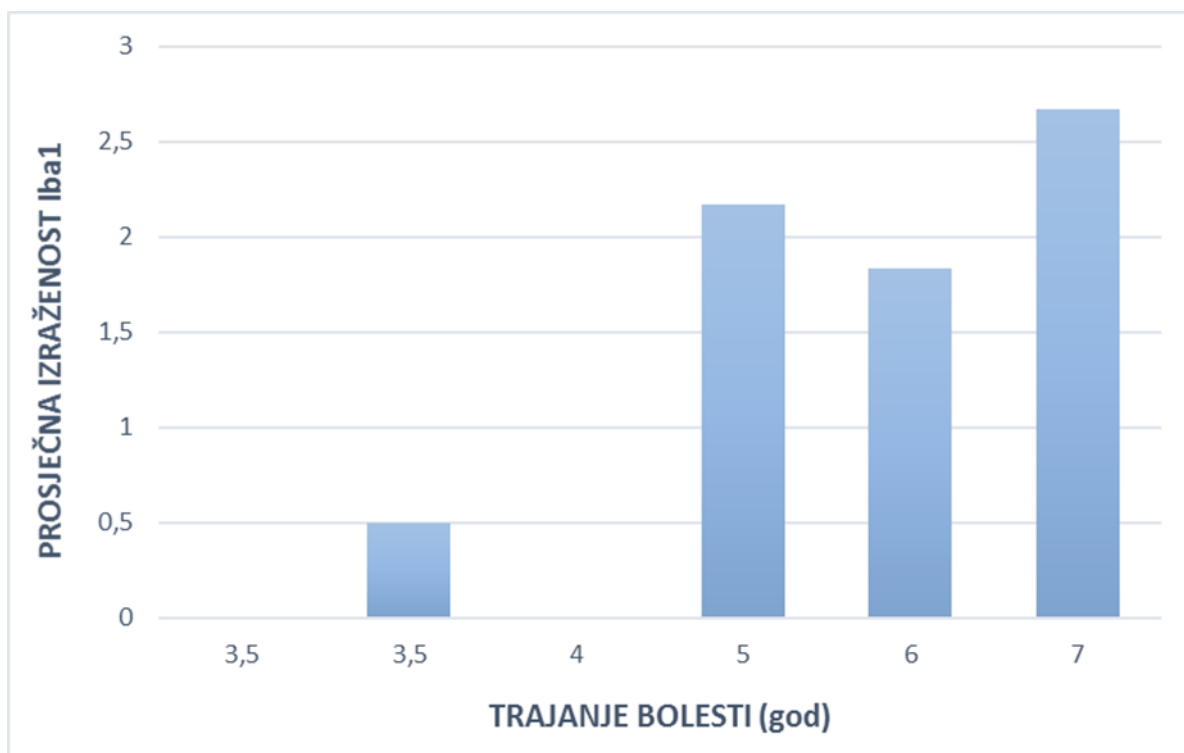
\* 0 = • 1 = ● 2 = ● 3 = ● 4 = ●

AB: Alzheimerova bolest; GD: *gyrus dentatus*; SUB: subikulum; BT: bijela tvar

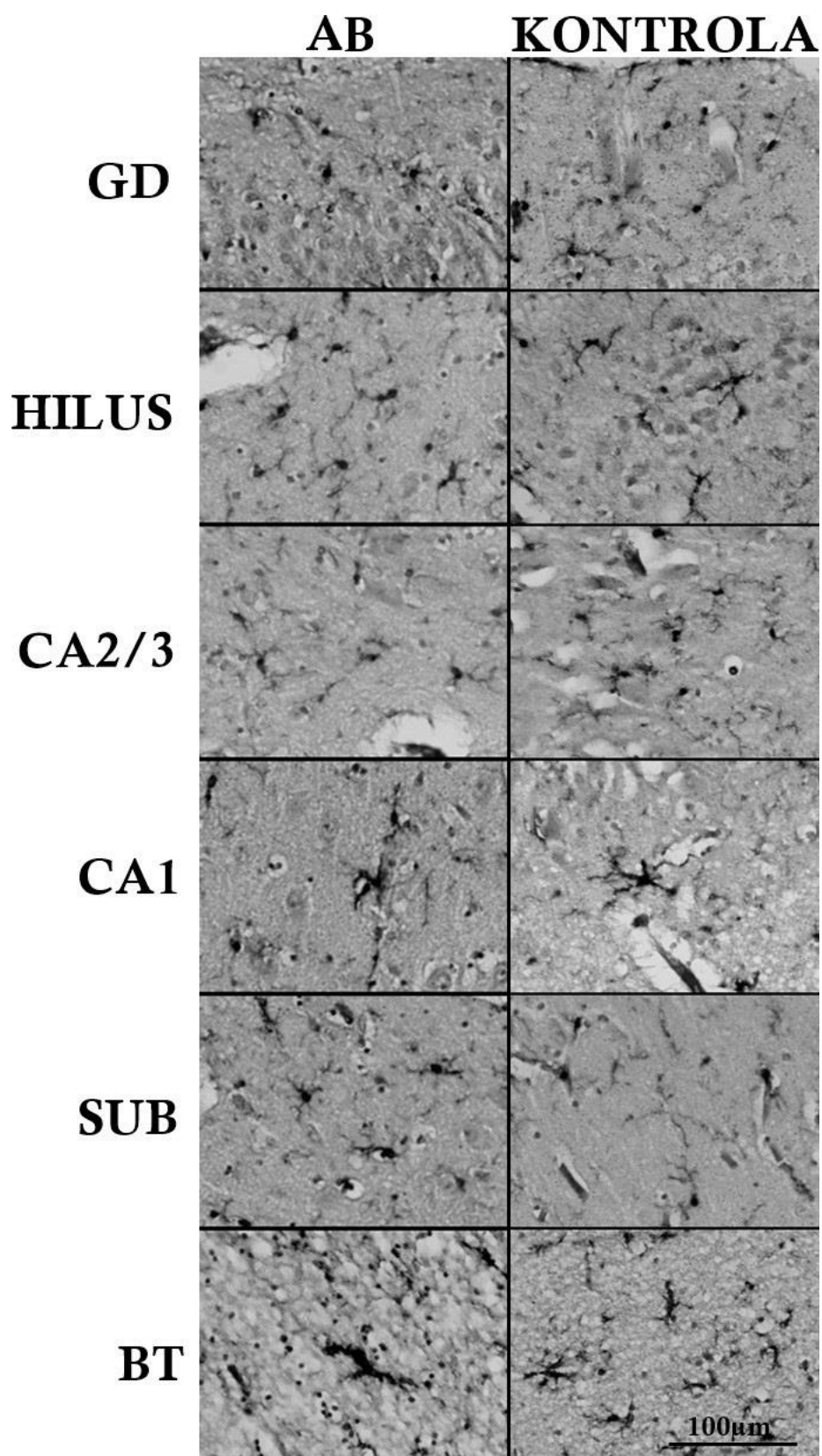
**Tablica 3.** Prosječna izraženost Iba1 po uzorcima osoba s Alzheimerovom bolesti (AB)\*

DOB (godine)	SPOL	TRAJANJE AB (godine)	PROSJEČNA IZRAŽENOST Iba1 PO UZORKU
84	Ž	3,5	•
77	M	3,5	•
73	Ž	4	•
80	Ž	5	●
80	Ž	6	●
73	M	7	●

\* 0 = • 0,5 = • 1,833 = ● 2,166 = ● 2,666 = ●



**Slika 5.** Usporedba prosječne izraženosti biljega Iba1 po uzorcima i duljine trajanja bolesti kod uzoraka oboljelih od Alzheimerove bolesti.



**Slika 6.** Izražaj biljega Iba1 po područjima hipokampalne formacije kod reprezentativnih uzoraka kontrole (uzorak: 417/95 ; Ž; 84 god) i AB (uzorak: 081/95; Ž; 80 god; AB = 6 god) vizualiziran imunohistokemijskim bojanjem (AB: Alzheimerova bolest; GD: *gyrus dentatus*; SUB: subikulum; BT: bijela tvar; povećanje 20X)

#### 4.2. Izraženost biljega CD68

Imunohistokemijskim bojanjem analizirana je izraženost biljega CD68. Biljeg pripada skupini receptora čistača, a kod mikroglia stanica uglavnom je izražen na fagocitnim lizosomima, te u manjoj mjeri na membrani (Hendrickx *i sur.*, 2017.). Biljegom su najbolje vidljive ameboidne mikroglia stanice s fagocitnom aktivnošću (Bachstetter *i sur.*, 2015.) što ga čini adekvatnim za proučavanje aktiviranih mikroglia stanica.

Izraženost biljega CD68 prikazana je u Tablici 4. U odnosu na biljega Iba1 i HLA-DR, izraženost CD68 je bila najjača i kod AB uzoraka i kod kontrola. U svih šest testiranih parova uzoraka (AB i kontrola) izražaj tog biljega bio je veći u uzorcima hipokampusa osoba s AB.

Prosječna izraženost biljega CD68 bila je veća u uzorcima osoba oboljelih od AB. Najveća aktivacija bila je prisutna u CA1 polju, zatim subikulu i hilusu fascije dentate, a najmanja u polju CA2/3. Međutim, čak je i najslabija uočena imunoreaktivnost u uzorcima hipokampusa osoba s AB bila jača od one u kontrolnim uzorcima. U kontrolnim uzorcima primijećena je slaba do srednja izraženost biljega, pri čemu je najveća prisutnost bila u bijeloj tvari, pa zatim u CA2/3 polju te najmanja u polju CA1.

Nije uočeno podudaranje stupnja izraženosti biljega CD68 i duljine trajanja bolesti, odnosno prisutnost biljega je bila podjednaka u svih oboljelih neovisno o duljini trajanja bolesti. U kontrolnim uzorcima također nije primijećeno podudaranje izraženosti biljega s dobi ispitanika.

Usporedbom s dostupnim podacima o broju amiloidnih plakova i NFS u različitim područjima hipokampalne formacije (Simic *i sur.*, 1998.) primijećeno je da se ukupan broj amiloidnih plakova i NFS po područjima podudara sa stupnjem imunoreaktivnosti biljega CD68. Izražaj biljega bio je najveći u polju CA1, a to je ujedno bilo i polje s najvećim brojem amiloidnih plakova i NFS (Slika 7).

Biljeg CD68 izražen je na fagocitnim lizosomima mikroglia stanica pa morfologija stanica nije jasno vidljiva (Slika 8). Prisutnost biljega odražava aktiviranost stanica jer prilikom aktivacije imaju i povećanu sposobnost fagocitoze.

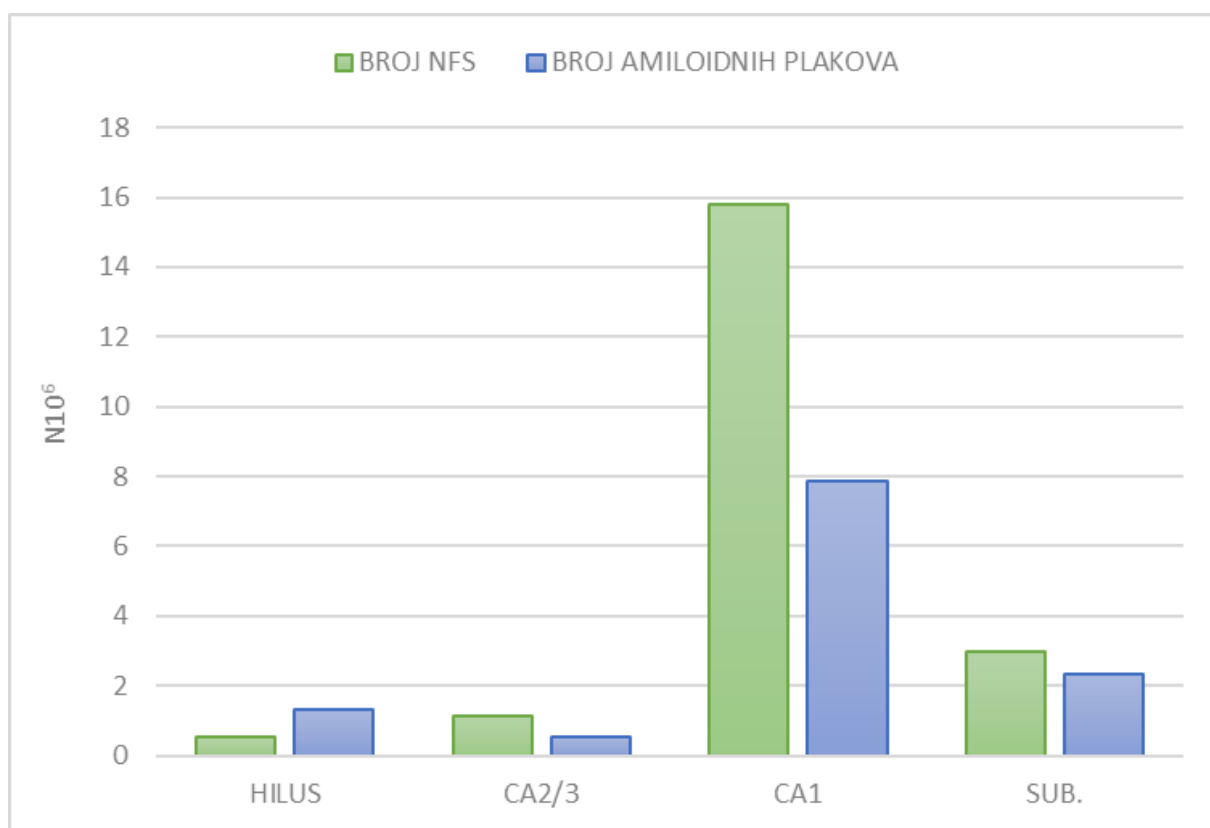
**Tablica 4.** Izražaj biljega CD68 po područjima hipokampalne formacije kod uzoraka s AB i kontrolnih uzoraka\*

UZORAK (AB)			PODRUČJE HIPOKAMPALNE FORMACIJE					
DOB (godine)	SPOL	TRAJANJE AB (godine)	GD	HILUS	CA2/3	CA1	SUB.	BT
80	Ž	6	●	●	●	●	●	●
73	M	7	●	●	●	●	●	●
80	Ž	5	●	●	●	●	●	●
84	Ž	3,5	●	●	●	●	●	●
73	Ž	4	●	●	●	●	●	●
77	M	3,5	●	●	●	●	●	●
PROSJEČNA IZRAŽENOST CD68 PO PODRUČJIMA			●	●	●	●	●	●
UZORAK (KONTROLA)		PODRUČJE HIPOKAMPALNE FORMACIJE						
DOB (godine)	SPOL	GD	HILUS	CA2/3	CA1	SUB.	BT	
84	Ž	●	●	●	●	●	●	
68	M	●	●	●	●	●	●	
77	Ž	●	●	●	●	●	●	
85	Ž	●	●	●	●	●	●	
62	Ž	●	●	●	●	●	●	
75	M	●	●	●	●	●	●	
PROSJEČNA IZRAŽENOST CD68 PO PODRUČJIMA		●	●	●	●	●	●	

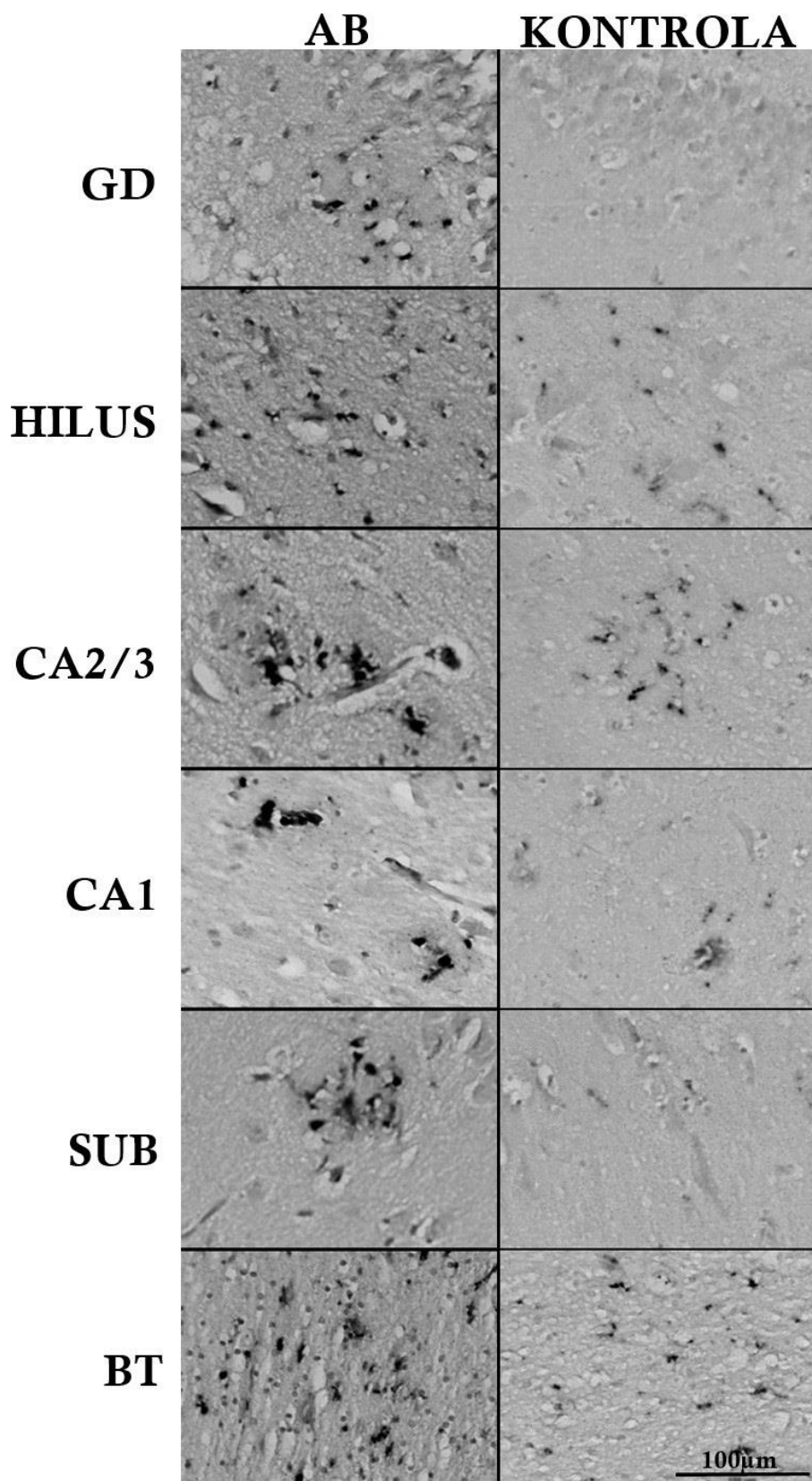
\* 0 = ● 1 = ● 2 = ● 3 = ● 4 = ●

AB: Alzheimerova bolest; GD: *gyrus dentatus*; SUB: subikulum; BT: bijela tvar





**Slika 7.** Ukupni broj amiloidnih plakova i neurofibrilarnih snopića po područjima hipokampalne formacije uzoraka oboljelih od AB.



**Slika 8.** Izražaj biljega CD68 po područjima hipokampalne formacije kod reprezentativnih uzoraka kontrole (uzorak: 169/95; Ž; 62 god) i AB (uzorak: 240/95; Ž; 80 god; AB = 5 god) vizualiziran imunohistokemijskim bojanjem (AB: Alzheimerova bolest; GD: gyrus dentatus; SUB: subikulum; BT: bijela tvar; povećanje 20X)

### 4.3. Izraženost biljega HLA-DR

Imunohistokemijskim bojanjem analizirana je izraženost biljega HLA-DR. Biljeg HLA-DR je receptor iz skupine MHC-II molekula. Zbog uključenosti u imunodne reakcije smatra se da je njegova izraženost povećana na stanicama koje sudjeluju u upali (Minett *i sur.*, 2016.), pa tako i aktivirane mikroglia stanice povećavaju izražaj tog biljega na membrani. Iz navedenih razloga, biljeg HLA-DR dobar je izbor za proučavanje aktiviranih mikroglia stanica (Hendrickx *i sur.*, 2017.).

Izraženost biljega HLA-DR prikazana je u Tablici 5. Od šest testiranih parova uzoraka AB i kontrola, četiri para pokazuju veći izražaj HLA-DR biljega kod AB uzoraka dok se u preostala dva para izražaj biljega nije značajno razlikovao između kontrolnih i AB uzoraka.

Iz analize prosječne izraženosti biljega HLA-DR zaključeno je kako je prisutnost HLA-DR bila nešto veća u uzorcima osoba oboljelih od AB u odnosu na kontrole, pri čemu je najveća prisutnost uočena u CA1 polju i subikulu. U moždanom tkivu osoba koje nisu oboljele od AB dokumentirana je slaba do srednja prisutnost HLA-DR biljega, a najviše je bio izražen u području bijele tvari.

U oboljelih od AB izraženost biljega HLA-DR ne razlikuje se s obzirom na duljinu trajanja bolesti niti na dob ispitanika. U kontrolnim uzorcima također nije pronađen pozitivan trend izraženosti toga biljega u odnosu na dob ispitanika.

Usporedbom s otprije kvantificiranim brojem amiloidnih plakova i NFS na susjednim rezovima, izraženost biljega HLA-DR podudara se s ukupnim brojem plakova i NFS. Područja s najvećom ukupnom imunoreaktivnošću (CA1 i subikul) ujedno su bila i područja s najviše amiloidnih plakova i NFS (Slika 7).

Oba biljega, HLA-DR i CD68, bila su prisutna u hipokampalnoj formaciji kontrola, a zbirni prikaz pokazuje da je prisutnost tih biljega bila najizraženija u bijeloj tvari. S druge strane, prisutnost biljega Iba1 u zdravih je ispitanika bio najmanje prisutan u bijeloj tvari.

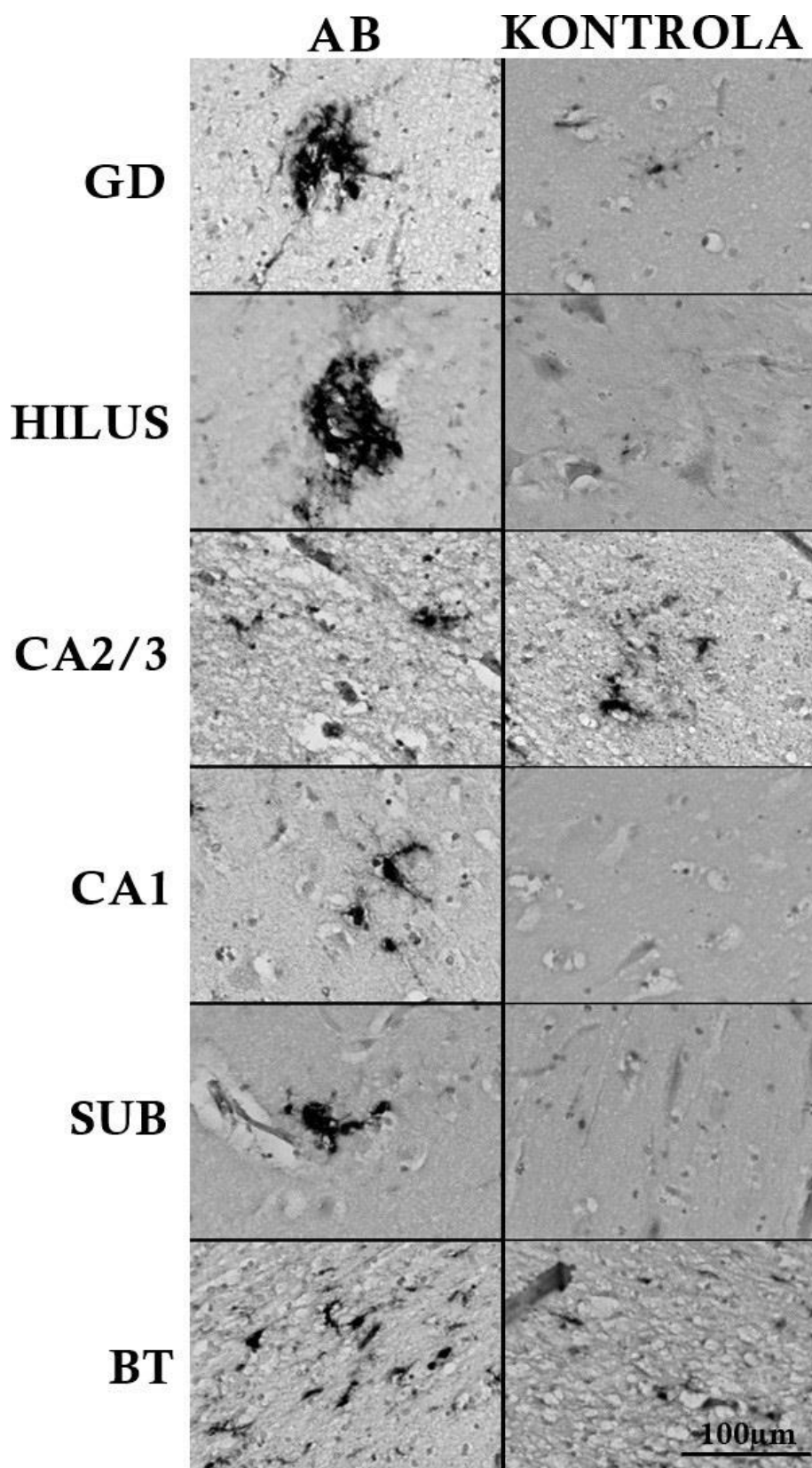
Mikroglia povećava izražaj biljega HLA-DR tijekom aktivacije pa su tim biljekom jasno vidljive aktivirane mikroglia stanice. U pojedinim područjima bile su prisutne velike nakupine aktiviranih mikroglia stanica (Slika 9.)

**Tablica 5.** Izraženost biljega HLA-DR po područjima hipokampalne formacije kod uzoraka s AB i kontrolnih uzoraka\*

UZORAK (AB)			PODRUČJE HIPOKAMPALNE FORMACIJE					
DOB (godine)	SPOL	TRAJANJE AB (godine)	GD	HILUS	CA2/3	CA1	SUB.	BT
80	Ž	6	●	●	●	●	●	●
73	M	7	•	•	•	•	•	•
80	Ž	5	●	•	•	●	●	●
84	Ž	3,5	●	●	●	●	●	●
73	Ž	4	•	•	●	•	•	•
77	M	3,5	●	•	•	●	●	●
PROSJEČNA IZRAŽENOST HLA-DR PO PODRUČJIMA			●	●	●	●	●	●
UZORAK (KONTROLA)		PODRUČJE HIPOKAMPALNE FORMACIJE						
DOB (godine)	SPOL	GD	HILUS	CA2/3	CA1	SUB.	BT	
84	Ž	•	•	•	•	●	•	
68	M	●	•	•	•	•	•	
77	Ž	●	●	●	●	●	●	
85	Ž	•	•	•	•	•	•	
62	Ž	●	●	●	●	●	●	
75	M	•	●	●	●	●	●	
PROSJEČNA IZRAŽENOST HLA-DR PO PODRUČJIMA		●	●	●	●	●	●	

\* 0 = • 1 = ● 2 = ● 3 = ● 4 = ●

AB: Alzheimerova bolest; GD: gyrus dentatus; SUB: subikulum; BT: bijela tvar



**Slika 9.** Izražaj biljega HLA-DR po područjima hipokampalne formacije kod reprezentativnih uzoraka kontrole (uzorak: 165/95; M; 68 god) i AB (uzorak: 081/95; Ž; 80 god; AB = 6 god) vizualiziran imunohistokemijskim bojanjem (AB: Alzheimerova bolest; GD: gyrus dentatus; SUB: subikulum; BT: bijela tvar; povećanje 20X)

## 5. RASPRAVA

Ovo pilot istraživanje ukazuje da se izražaj biljega mikroglia stanica razlikuje u mozgu osoba oboljelih od Alzheimerove bolesti i kontrola. U četiri od šest parova uzoraka (jedan kontrolni i jedan AB približno iste starosti) biljeg Iba1 bio je jače izražen u kontrola. Dobiveni rezultat u skladu je s poznatom činjenicom kako je biljeg Iba1 najjače izražen na neaktiviranim mikroglia stanicama te u početnoj fazi aktivacije. Također, upotrebom tog biljega jasno je bila vidljiva razgranata morfologija mikroglia stanica u mirovanju. Dosadašnje studije o izražaju biljega Iba1 pokazuju različite rezultate. Desetak studija pokazalo je porast izražaja biljega u AB, deset ih nije pokazalo razliku između oboljelih od AB i kontrola dok je čak pet studija pokazalo smanjen izražaj biljega Iba1 u AB u odnosu na kontrole. Studije koje su istraživale izražaj biljega u hipokampusu daju slične rezultate. U tri je zabilježen veći izražaj u AB, u pet nije bilo razlike i u jednoj je izražaj biljega Iba1 manji u AB nego u kontrola (Hopperton *i sur.*, 2017.). Rezultati ovog istraživanja u skladu su sa studijama koje su pokazale smanjenu prisutnost Iba1 u oboljelih od AB (npr. Hopperton *i sur.*, 2017.; Minett *i sur.*, 2016.). Jedna od tih studija također je pokazala da je izražaj Iba1 bio manji u osoba s alelom  $\epsilon 4$  gena *APOE* kojega se povezuje s povećanim rizikom za obolijevanje od AB, dok je u osoba s alelom  $\epsilon 2$  koje imaju smanjeni rizik za AB izražaj Iba1 bio povećan (Minett *i sur.*, 2016.).

Istraživanje je pokazalo i različiti izražaj biljega u različitim regijama hipokampalne formacije. Navedeni nalaz potvrđuje hipotezu kako su neka polja hipokampusa osjetljivija za nastanak patoloških promjena karakterističnih za AB od drugih, te da AB nije ubrzano starenje, nego poseban patološki proces. Na temelju ovih rezultata može se pretpostaviti mogući tijek širenja patoloških promjena, naročito promjena proteina tau, između neuroanatomski povezanih područja entorinalne moždane kore i hipokampalne formacije.

Primijećen pozitivan trend izražaja Iba1 i duljine trajanja bolesti možda bi se mogao objasniti promjenama fenotipa mikroglia stanica tijekom napredovanja patološkog procesa.

Biljeg CD68 najviše je izražen na fagocitnim lizosomima pa se stoga smatra biljegom aktiviranih mikroglia stanica koje aktivacijom imaju povećanu sposobnost fagocitoze. Rezultati ovog istraživanja pokazali su veći izražaj biljega u uzorcima oboljelih od AB u odnosu na kontrole i time podržavaju hipotezu o aktivaciji upalnih procesa tijekom AB. Rezultati su u skladu s dosad poznatom literaturom koja pokazuje također veći izražaj CD68 kod osoba oboljelih od AB ali i kod osoba koje su pretrpjele neki oblik sistemske upale. Navedeni podaci su potvrda da je biljeg CD68 primarno izražen na aktiviranim mikroglia stanicama (Hopperton

*i sur.*, 2017.; Tischer *i sur.*, 2016.). Izražaj biljega povećan je i kod osoba s alelom  $\epsilon 4$  gena *APOE*, a smanjen kod osoba s alelom  $\epsilon 2$  (Minett *i sur.*, 2016.).

Ovo istraživanje pokazuje da je izražaj biljega CD68 kod uzoraka hipokampusa osoba s AB bio najveći u CA1 polju i subikulu što je u skladu s jednom od objavljenih studija (Taipa *i sur.*, 2017.). Suprotno tome, izražaj biljega kod kontrolnih uzoraka bio je najveći u bijeloj tvari, a najmanji u CA1 polju što bi moglo značiti da se tijekom procesa biološkog starenja mikroglia stanice najprije aktiviraju u području bijele tvari dok je CA1 regija osjetljivija na promjene tijekom AB.

Zbog izražaja biljega na fagocitnim lizosomima, morfologija mikroglia stanica nije dobro vidljiva, ali mogu se jasno vidjeti grupacije stanica u nakupine što je svojstveno aktiviranim mikroglia stanicama.

Biljeg HLA-DR također je biljeg aktivirane mikroglia stanice. To potvrđuje činjenica da je uključen u proces prezentacije antigena i stoga mu se izražaj povećava tijekom upalnih procesa. Istraživanjem je pokazan veći izražaj tog biljega kod uzoraka oboljelih od AB što je u skladu s hipotezom o aktivaciji mikroglia stanica tijekom upalnih procesa u AB. Također, u AB uzorcima vidljive su veće nakupine stanica, što je karakteristično za aktivirane mikroglia stanice. Većina dosad objavljenih studija govori o povećanom izražaju biljega HLA-DR u AB u odnosu na kontrole (Hopperton *i sur.*, 2017.). Isto kao i CD68, biljeg HLA-DR povećano je izražen kod osoba koje su pretrpjele neki oblik sistemske upale i kod osoba s alelom  $\epsilon 4$  gena *APOE* (Minett *i sur.*, 2016.; Tischer *i sur.*, 2016.). Jedna studija potvrdila je i veći izražaj biljega HLA-DR u CA1 polju (Xiang *i sur.*, 2006.), što se potvrdilo i u našem istraživanju.

Zbog potrebe za čišćenjem neadekvatno formiranih proteina i njihovih nakupina, mikroglia stanice su u AB jače aktivirane u blizini amiloidnih plakova i NFS. Ovim istraživanjem pokazali smo da je izražaj biljega CD68 i HLA-DR a time i aktivacija mikroglia stanica bila najveća u CA1 polju i subikulu, gdje je ujedno bio i najveći broj amiloidnih plakova i NFS. Ti rezultati potvrđuju hipotezu o aktivaciji mikroglia stanica uslijed nakupljanja amiloida  $\beta$  i hiperfosforiliranog proteina tau. Od ranije je poznato da su CA1 polje i subikul najviše pogođene u AB. U navedenim poljima je primijećen najveći gubitak neurona te odlaganje plakova A $\beta$  i NFS (Braak i Braak, 1991a.; Šimić *i sur.*, 1997.; West *i sur.*, 2004.). Rezultati ove studije stoga idu u prolog hipotezi o štetnom utjecaju pretjerane aktivacije mikroglia stanica na neurone i na razvoj patologije AB.

Oba biljega aktiviranih mikroglia stanica, HLA-DR i CD68 su bila prisutna i u hipokampalnoj formaciji osoba koje nisu bolovale od AB, a zbirni prikaz pokazao je da je prisutnost tih biljega kod kontrolnih uzoraka bio najizraženiji u bijeloj tvari. S druge strane, izražaj biljega Iba1 u zdravih je ispitanika bio najmanji u bijeloj tvari.

Istraživanje nije potvrdilo početnu pretpostavku o pozitivnoj korelaciji aktivacije mikroglia stanica i duljine trajanja bolesti. Nismo pronašli veći izražaj biljega CD68 i HLA-DR kod osoba koje su bolovale od AB dulje od pet godina i onih kod kojih je bolest trajala kraće od četiri godine. Uzrok tome mogao bi biti mali broj analiziranih uzoraka te semikvantitativni način kvantifikacije izražaja biljega. Korištena skala opisa uz brojeve 0-4 vjerojatno nije dovoljno precizna da bi pokazala manje razlike u aktivaciji mikroglia stanica između uzoraka te je prikladnija za prikaz ukupne ili prosječne imunoreaktivnosti.

Glavna ograničenja studije su mali broj analiziranih uzoraka te način kvantifikacije, no navedene metode bile su dovoljne za postizanje glavnih ciljeva ovog pilot istraživanja. Da bi se daljnjim istraživanjima preciznije utvrdio obrazac aktivacije mikroglia stanica, ona bi trebala uključivati veći broj uzoraka i precizniji oblik kvantifikacije prisutne imunoreaktivnosti.

Najvažnija saznanja dobivena ovim istraživanjem su podudaranje izražaja biljega aktiviranih mikroglia stanica, CD68 i HLA-DR s pojavom AB i njihov povećani izražaj u područjima najviše zahvaćenim patologijom AB, te negativan trend izražaja Iba1 u AB. Opisani rezultati mogli bi se objasniti razmatranjem uloge ispitivanih biljega. Biljeg Iba1 važan je za formiranje snopova aktinskih niti, a time igra važnu ulogu u pokretljivosti mikroglia stanica. Da bi mikroglia stanice adekvatno vršile funkciju nadzora u CNS-u važna je dobra pokretljivost njihovih dugih ogranaka te pokretljivost samih stanica kada se javi potreba za interveniranjem. Veći izražaj Iba1 u zdravih ispitanika mogao bi značiti da su njihove mikroglia stanice dovoljno pokretljive i time adekvatno štite neurone, dok su mikroglia stanice oboljelih od AB sa smanjenim izražajem Iba1 možda izgubile sposobnost adekvatnog reagiranja na štetne signale. CD68 ima važnu ulogu u procesu fagocitoze, a HLA-DR u prezentaciji antigena pa s druge strane, njihov povećani izražaj možda dovodi do pretjerane aktivacije mikroglia stanica, a time i do štetnog utjecaja na neurone, što potvrđuju i nalazi jače aktivnosti stanica u područjima najjače zahvaćenim patološkim promjenama u AB.



## 6. ZAKLJUČAK

Ovo pilot istraživanje pokazalo je da se izražaj biljega mikroglia stanica razlikuje u mozgu osoba oboljelih od AB i kontrola. Pronađen je povećani izražaj biljega aktiviranih mikroglia stanica, CD68 i HLA-DR u uzorcima s AB te u područjima hipokampalne formacije koja su najviše zahvaćena patološkim promjenama u AB, te negativan trend izražaja Iba1 u AB. Dobiveni rezultati stoga podupiru hipoteze o ulozi upale u neurodegenerativnim bolestima i štetnom utjecaju mikroglia stanica u AB. Kako bi se daljnjim istraživanjima preciznije utvrdio obrazac aktivacije mikroglia stanica tijekom nastanka i napredovanja AB, ona bi trebala uključivati veći broj uzoraka i precizniji oblik kvantifikacije prisutne imunoreaktivnosti.

## 7. LITERATURA

- Albert MS, DeKosky ST, Dickson D, Dubois B, Feldman HH, Fox NC, et al. (2011). The diagnosis of mild cognitive impairment due to Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on. *Alzheimer's Dement* **7**: 270–279.
- Arriagada P V., Growdon JH, Hedley-Whyte ET, Hyman BT (1992). Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease. *Neurology* **42**: 631–631.
- Ashworth S, Westerman K, Ahrenholz FALKE (1999). Constitutive and regulated  $\alpha$ -secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 3922–3927.
- Bachstetter AD, Eldik LJ Van, Schmitt FA, Neltner JH, Ighodaro ET, Webster SJ, Patel E, Abner EL, Kryscio RJ, Nelson PT (2015). Disease-related microglia heterogeneity in the hippocampus of Alzheimer's disease, dementia with Lewy bodies, and hippocampal sclerosis of aging. *Acta Neuropathol Commun* **3**: 32.
- Barrientos RM, Kitt MM, Watkins LR, Maier SF (2016). Neuroinflammation in the normal aging hippocampus. *Neuroscience* **36**: 1011–1014.
- Bas AI 'T V, Ruitenberg A, Hofman A, Launer LJ, Duijn CM VAN, Stijnen T, Breteler M, Stricker B (2001). Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs and the Risk of Alzheimer's Disease. *N Engl J Med* **345**: 1515–1521.
- Bernhardi R von, Eugénín-von Bernhardi L, Eugénín J (2015). Microglial cell dysregulation in brain aging and neurodegeneration. *Front Aging Neurosci* **7**: 1–21.
- Bierer LM, Patrick R, Schmeidler J, Perl DP, Carlin L (1995). Neocortical Neurofibrillary Tangles Correlate With Dementia Severity in Alzheimer's Disease. *Arch Neurol* **52**: 81–88.
- Blenow K, Leon MJ de, Zetterberg H (2006). Alzheimer's disease. *Lancet* **368**: 387–403.
- Bliss TVP, Collingridge GL (1993). A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* **361**: 31–39.
- Braak E, Braak H, Mandelkow E (1994). A sequence of cytoskeleton changes related to the

- formation of neurofibrillary tangles and neuropil threads. *Acta Neuropathol* **87**: 554–567.
- Braak E, Griffing K, Arai K (1999). Neuropathology of Alzheimer's disease : what is new since A. Alzheimer? *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* **249**: 14–22.
- Braak H, Braak E (1991a). Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol* **82**: 239–259.
- Braak H, Braak E (1991b). Demonstration of Amyloid Deposits and Neurofibrillary Changes in Whole Brain Sections. *Brain Pathol* **1**: 213–216.
- Citron M, Westaway D, Xia W, Carlson G, Diehl T, Levesque G, et al. (1997). Mutant presenilins of Alzheimer's disease increase production of 42-residue amyloid  $\beta$ -protein in both transfected cells and transgenic mice. *Nature* **3**: 67–72.
- Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, et al. (1993). Gene Dose of Apolipoprotein E Type 4 Allele and the Risk of Alzheimer's Disease in Late Onset Families. *Science* **261**: 921–923.
- Cunningham E, Souza E De (1993). Interleukin 1 receptors in the brain and endocrine tissues. *Immunol Today* **14**: 166–170.
- D'Andrea MR (2005). Evidence that immunoglobulin-positive neurons in Alzheimer's disease are dying via the classical antibody-dependent complement pathway. *Am J Alzheimers Dis Other Demen* **20**: 144–150.
- Davies P, Maloney AJ. (1979). Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease. *Lancet* **308**: 1403.
- Drachman DA (2006). Aging of the brain , entropy , and Alzheimer disease. *Neurology* **67**: 1340–1352.
- Drachman DA, Leavitt J (1974). Human Memory and the Cholinergic System. *Arch Neurol* **30**: 113–121.
- Gatz M, Reynolds C a, Fratiglioni L, Johansson B, Mortimer J a, Berg S, Fiske A, Pedersen NL (2006). Role of genes and environments for explaining Alzheimer's disease. *Arch Gen Psychiatry* **63**: 168–74.
- Ginhoux F, Greter M, Leboeuf M, Nandi S, See P, Mehler MF, Gokhan S, Conway SJ, Ng LG, Stanley ER,

- Samokhvalov IM, Merad M (2010). Fate Mapping Analysis Reveals That Adult Microglia Derive from Primitive Macrophages. *Science* **330**: 841–845.
- Ginhoux F, Lim S, Hoeffel G, Low D, Huber T, Cuadros MA (2013). Origin and differentiation of microglia. *Front Cell Neurosci* **7**: 1–14.
- Giri M, Zhang M, Lu Y (2016). Genes associated with Alzheimer ' s disease : an overview and current status. *Clin Interv Aging* **11**: 665–681.
- Glenner GG, Wong CW (1984). Alzheimer's disease and Down's syndrome sharing of a unique cerebrovascular amyloid fibril protein. *Biochem Biophys Res Commun* **122**: 1131–1135.
- Goate AM, Chartier-Harlin MC, Mullan M, Brown J, Crawford F, Fidani L, i sur. (1991). Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature* **349**: 704–706.
- Hardy J, Allsop D (1991). Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. *Trends Pharmacol Sci* **12**: 383–388.
- Hardy JA, Higgins GA, Hardy JA, Higgins GA (1992). Alzheimer ' s Disease : The Amyloid Cascade Hypothesis Published by : American Association for the Advancement of Science Alzheimer ' s Disease : The Amyloid Cascade Hypothesis. *Science* **256**: 184–185.
- Hendrickx DAE, Eden CG van, Schuurman KG, Hamann J, Huitinga I (2017). Staining of HLA-DR, Iba1 and CD68 in human microglia reveals partially overlapping expression depending on cellular morphology and pathology. *J Neuroimmunol* **309**: 12–22.
- Hippius H, Neundörfer G (2003). The discovery of Alzheimer's disease. *Dialogues Clin Neurosci* **5**: 101–108.
- Hoek RM, Ruuls SR, Murphy CA, Wright GJ, Zurawski SM, Blom B, i sur. (2000). Down-Regulation of th Macrophage Lineage Thro Interaction with OX2 ( CD200). *Science* **290**: 1768–1771.
- Hope T, Keene J, Gedling K, Cooper S, Fairburn C, Jacoby R (1997). Behaviour changes in dementia 1: Point of entry data of a prospective study. **12**: 1062–1073.
- Hopperton KE, Mohammad D, Trépanier MO, Giuliano V, Bazinet RP (2017). Markers of

microglia in postmortem brain samples from patients with Alzheimer's Disease: a systematic review. *Mol Psychiatry* u tisku:10.1038/mp.2017.246.

- Jack CR, Albert MS, Knopman DS, McKhann GM, Sperling RA, Carrillo MC, i sur. (2011). Introduction to the recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimer's Dement* **7**: 257–262.
- Jellinger KA (2004). Head injury and dementia. *Curr Opin Neurol* **17**: 719–23.
- Jiang Y, Deacon R, Anthony DC, Campbell SJ (2008). Inhibition of peripheral TNF can block the malaise associated with CNS inflammatory diseases. *Neurobiol Dis* **32**: 125–132.
- Jonsson T, Atwal JK, Steinberg S, Snaedal J, Jonsson P V, Bjornsson S, Jonsson, Stefansson H, Sulem P, Gudbjartsson D, Maloney J, Hoyte K, Gustafson A, Liu Y, Lu Y, Bhangale T, Graham RR, Huttenlocher J, Bjornsdottir G, Andreassen OA, Palotie A, Behrens TW, Magnusson OT, Kong A, Thorsteinsdottir U, Jo EG, Watts, RJ, Stefansson K (2012). A mutation in APP protects against Alzheimer's disease and age-related cognitive decline. *Nature* **488**: 96–99.
- Lawson LJ, Perry VH, Dri P, Rlksn SG (1990). Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience* **39**: 151–170.
- Letiembre M, Hao W, Liu Y, Walter S (2007). Innate immune receptor expression in normal brain aging. *Neuroscience* **146**: 248–254.
- Levy-Lahad AE, Wasco W, Poorkaj P, Romano DM, Pettingell WH, Yu C, i sur. (1995). Candidate Gene for the Chromosome 1 Familial Alzheimer ' s Disease Locus. *Science* **269**: 973–977.
- Liu C-C, Kanekiyo T, Xu H, Bu G (2013). Apolipoprotein E and Alzheimer disease: risk, mechanisms, and therapy. *Nat Rev Neurol* **9**: 106–118.
- Liu X, Wu Z, Hayashi Y, Nakanishi H (2012). Age-dependent neuroinflammatory responses and deficits in long-term potentiation in the hippocampus during systemic inflammation. *Neuroscience* **216**: 133–142.
- Lyness SA, Zarow C, Chui HC (2003). Neuron loss in key cholinergic and aminergic nuclei in Alzheimer disease: A meta-analysis. *Neurobiol Aging* **24**: 1–23.

- Maezawa I, Zimin PI, Wulff H, Jin LW (2011). Amyloid- $\beta$  protein oligomer at low nanomolar concentrations activates microglia and induces microglial neurotoxicity. *J Biol Chem* **286**: 3693–3706.
- Martin SJ, Morris RGM (2002). New Life in an Old Idea : The Synaptic Plasticity and Memory Hypothesis Revisited. *Hippocampus* **12**: 609–636.
- Masters CL, Simms G, Weinman NA, Multhaup G, McDonald BL, Beyreuther K (1985). Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* **82**: 4245–4249.
- Mawanda F, Wallace R (2013). Can Infections Cause Alzheimer ' s Disease ? *Epidemiol Rev* **35**: 161–180.
- Mayeux R (2003). Epidemiology of neurodegeneration. *Annu Rev Neurosci* **26**: 81–104.
- McKhann GM, Knopman DS, Chertkow H, Hyman BT, Jack CR, Kawas CH, i sur. (2011). The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimer's Dement* **7**: 263–269.
- Mega MS, Cummings JL, Fiorello T, Gornbein J (1996). The spectrum of behavioral changes in Alzheimer ' s. *Neurology* **46**: 130–135.
- Michelucci A, Heurtaux T, Grandbarbe L, Morga E, Heuschling P (2009). Characterization of the microglial phenotype under specific pro-inflammatory and anti-inflammatory conditions: Effects of oligomeric and fibrillar amyloid- $\beta$ . *J Neuroimmunol* **210**: 3–12.
- Minett T, Classey J, Matthews FE, Fahrenhold M, Taga M, Brayne C, i sur. (2016). Microglial immunophenotype in dementia with Alzheimer's pathology. *J Neuroinflammation* **13**: 1–10.
- Mirra SS, Heyman A, McKeel D, Sumi SM, Crain BJ, Brownlee LM, i sur. (1991). The Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease (CERAD): Part II. Standardization of the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease. *Neurology* **41**: 479–479.
- Mittelbronn M, Dietz K, Shluesener HJ, Meyermann R (2001). Local distribution of microglia in the normal adult human central nervous system differs by up to one order of magnitude. *Acta Neuropathol* **101**: 249–255.

- Nakagawa Y, Chiba K (2014). Role of microglial M1/M2 polarization in relapse and remission of psychiatric disorders and diseases. *Pharmaceuticals* **7**: 1028–1048.
- Ohsawa K, Imai Y, Sasaki Y, Kohsaka S (2004). Microglia/macrophage-specific protein Iba1 binds to fimbrin and enhances its actin-bundling activity. *J Neurochem* **88**: 844–856.
- Ouyang X, Negishi H, Takeda R, Fujita Y, Taniguchi T (2007). Cooperation between MyD88 and TRIF pathways in TLR synergy via IRF5 activation. *Biochem Biophys Res Commun* **354**: 1045–1051.
- Padurariu M, Ciobica A, Lefter R, Serban IL (2013). The oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease. *Psychiatr Danub* **25**: 401–409.
- Palmer AM (1996). Neurochemical Studies of Alzheimer's Disease. **5**: 381–391.
- Palmer AM, Palmer AM (2002). Pharmacotherapy for Alzheimer's disease : progress and prospects. **23**: 426–433.
- Perry H (1977). Neurotransmitter enzyme abnormalities in senile dementia. *J Neurol Sci* **34**: 247–265.
- Robbins TW, Murphy ER (2006). Behavioural pharmacology : 40 + years of progress , with a focus on glutamate receptors and cognition. *Trends Pharmacol Sci* **27**: 141–148.
- Rosa D, Procaccini C, Pucino V, Rosa V De, Marone G, Matarese G (2014). Neuro-endocrine networks controlling immune system in health and disease. *Front Immunol* **5**: .
- Sardi F, Fassina L, Venturini L, Inguscio M, Guerriero F, Rolfo E, i sur. (2011). Autoimmunity Reviews Alzheimer's disease, autoimmunity and inflammation. The good, the bad and the ugly. *Autoimmun Rev* **11**: 149–153.
- Schliebs R, Arendt T (2011). The cholinergic system in aging and neuronal degeneration. *Behav Brain Res* **221**: 555–563.
- Selkoe DJ (2001). Alzheimer's Disease : Genes , Proteins , and Therapy. **81**: 741–766.
- Serrano-Pozo A, Mielke ML, Gómez-Isla T, Betensky RA, Growdon JH, Frosch MP, i sur. (2011). Reactive glia not only associates with plaques but also parallels tangles in Alzheimer's disease. *Am J Pathol* **179**: 1373–1384.
- Šimić G, Babić Leko M, Wray S, Harrington CR, Delalle I, Jovanov-Milošević N, i sur. (2017). Monoaminergic neuropathology in Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol* **151**:

101–138.

- Šimić G, Kostović I, Winblad B, Bogdanović N (1997). Volume and number of neurons of the human hippocampal formation in normal aging and Alzheimer's disease. *J Comp Neurol* **379**: 482–494.
- Simic G, Winblad B, Bogdanovic N (1998). Relationship between hippocampal neurofibrillary degeneration and neuronal loss in aging and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* **19**: 239.
- Sperling RA, Aisen PS, Beckett LA, Bennett DA, Craft S, Fagan AM, i sur. (2011). Toward defining the preclinical stages of Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging- Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimer's Dement* **7**: 280–292.
- St George-Hyslop PH, Haines JL, Rogaev E, Mortilla M, Vaula G, Pericak-Vance M, i sur. (1992). Genetic evidence for a novel familial Alzheimer's disease locus on chromosome 14. *Nature* **2**: 330–334.
- Swerdlow RH, Khan SM (2004). A “ mitochondrial cascade hypothesis ” for sporadic Alzheimer ' s disease. *Med Hypotheses* **63**: 8–20.
- Taipale R, Brochado P, Robinson A, Reis I, Costa P, Mann DM, i sur. (2017). Patterns of Microglial Cell Activation in Alzheimer Disease and Frontotemporal Lobar Degeneration. *Neurodegener Dis* **17**: 145–154.
- Tang Y, Le W (2016). Differential Roles of M1 and M2 Microglia in Neurodegenerative Diseases. *Mol Neurobiol* **53**: 1181–1194.
- Tischer J, Krueger M, Mueller W, Staszewski O, Prinz M, Streit WJ, i sur. (2016). Inhomogeneous distribution of Iba-1 characterizes microglial pathology in Alzheimer's disease. *Glia* **64**: 1562–1572.
- Tokuda T, Fukushima T, Ikeda S, Sekijima Y, Shoji S, Yanagisawa N, i sur. (1997). Plasma Levels of amyloid  $\beta$  proteins A $\beta$ 1–40 and A $\beta$ 1–42(43) are elevated in Down's syndrome. *Ann Neurol* **41**: 271–273.
- Tucsek Z, Toth P, Sosnowska D, Gautam T, Mitschelen M, Koller A, i sur. (2014). Obesity in Aging Exacerbates Blood – Brain Barrier Disruption , Neuroinflammation , and Oxidative Stress in the Mouse Hippocampus : Effects on Expression of Genes Involved



- in Beta-Amyloid Generation and Alzheimer ' s Disease. *Journals Gerontol Biol Sci* **69**: 1212–1226.
- Vassar R, Bennett BD, Babu-khan S, Kahn S, Mendiaz EA, Denis P, i sur. (1999).  $\beta$ -Secretase Cleavage of Alzheimer ' s Amyloid Precursor Protein by the Transmembrane Aspartic Protease BACE. *Science* **286**: 735–741.
- West MJ, Gundersen HJG (1990). Unbiased stereological estimation of the number of neurons in the human hippocampus. *J Comp Neurol* **296**: 1–22.
- West MJ, Kawas CH, Stewart WF, Rudow GL, Troncoso JC (2004). Hippocampal neurons in pre-clinical Alzheimer ' s disease. *Neurobiol Aging* **25**: 1205–1212.
- Wippold FJ, Cairns N, Vo K, Holtzman DM, Morris JC (2008). Neuropathology for the neuroradiologist: Plaques and tangles. *Am J Neuroradiol* **29**: 18–22.
- Xiang Z, Haroutunian V, Ho L, Purohit D, Pasinetti GM (2006). Microglia activation in the brain as inflammatory biomarker of Alzheimer's disease neuropathology and clinical dementia. *Dis Markers* **22**: 95–102.
- Ye S, Johnson RW (1999). Increased interleukin-6 expression by microglia from brain of aged mice. *J Neuroimmunol* **93**: 139–148.
- Yeh FL, Hansen D V., Sheng M (2017). TREM2, Microglia, and Neurodegenerative Diseases. *Trends Mol Med* **23**: 512–533.
- Zandi PP, Anthony JC, Hayden KM, Mehta K, Mayer L, Breitner JCS (2002). Reduced incidence of AD with NSAID but not H2 receptor antagonists: The Cache County Study. *Neurology* **59**: 880–886.
- Zotova E, Nicoll JAR, Kalaria R, Holmes C, Boche D (2010). Inflammation in Alzheimer ' s disease: relevance to pathogenesis and therapy. *Alzheimer's Res Ther* **2**: 1–9.

## 8. ŽIVOTOPIS

Rođena sam u Karlovcu 21.3.1994. godine gdje sam završila osnovnoškolsko obrazovanje u Osnovnoj školi Turanj, te srednjoškolsko obrazovanje u Gimnaziji Karlovac, opći smjer. 2013. godine upisala sam Preddiplomski sveučilišni studij znanosti o okolišu na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu, te 2016. godine stekla zvanje sveučilišna prvostupnica znanosti o okolišu. Diplomski sveučilišni studij eksperimentalne biologije, modul: Fiziologija i imunobiologija upisala sam 2016. godine. Tijekom studija sudjelovala sam na manifestacijama za popularizaciju znanosti, Noć biologije i Znanstveni piknik. Diplomski rad izradila sam tijekom laboratorijske prakse u Laboratoriju za razvojnu neuropatologiju pod vodstvom prof. dr. sc. Gorana Šimića na Hrvatskom institutu za istraživanje mozga. Kao posebna područja interesa istaknula bi neurofiziologiju i imunologiju.