Povezanost medijatora upale te aktivacije mikroglije i inflamasoma s biološkim biljezima Alzheimerove bolesti

Španić Popovački, Ena

Doctoral thesis / Disertacija

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:444436

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository

DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Ena Španić Popovački

Povezanost medijatora upale te aktivacije mikroglije i inflamasoma s biološkim biljezima Alzheimerove bolesti

DISERTACIJA

Zagreb, 2023.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Ena Španić Popovački

Povezanost medijatora upale te aktivacije mikroglije i inflamasoma s biološkim biljezima Alzheimerove bolesti

DISERTACIJA

Zagreb, 2023.

Disertacija je izrađena na Hrvatskom institutu za istraživanje mozga Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, temeljem projekta Hrvatske zaklade za znanost (HRZZ) "Razvoj karijera mladih istraživača - izobrazba novih doktora znanosti" (br. DOK-09-2018, voditelj prof. dr. sc. Goran Šimić), predloženog u okviru projekta HRZZ-a „Hiperfosforilacija, agregacija i transsinaptički prijenos tau proteina u Alzheimerovoj bolesti: analiza likvora i ispitivanje potencijalnih neuroprotektivnih spojeva" IP-2014-09-9730, na kojem je voditelj projekta prof. dr. sc. Goran Šimić.

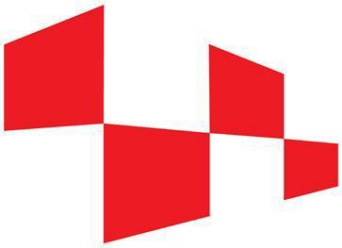
Voditelj rada: prof. dr. sc. Goran Šimić

Ovo istraživanje financirano je sredstvima Hrvatske zaklade za znanost, projekti Hrvatske zaklade za znanost:

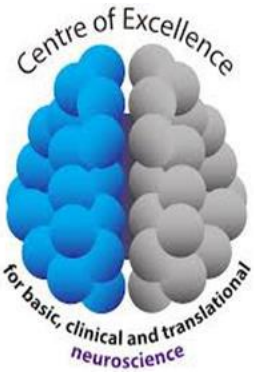
1. „Hiperfosforilacija, agregacija i transsinaptički prijenos tau proteina u Alzheimerovoj bolesti: analiza likvora i ispitivanje potencijalnih neuroprotektivnih spojeva" HRZZ IP-2014-09-9730, voditelj projekta prof. dr. sc. Goran Šimić

2. „Uloga krvno-moždane barijere, urođene imunosti i oligomerizacije tau proteina u patogenezi Alzheimerove bolesti" HRZZ IP-2019-04-3584, voditelj projekta prof. dr. sc. Goran Šimić

te sredstvima Znanstvenog centra izvrsnosti za temeljnu, kliničku i translacijsku neuroznanost, projekt: „Eksperimentalna i klinička istraživanja hipoksijsko-ishemijskog oštećenja mozga u perinatalnoj i odrasloj dobi, KK.01.1.1.01.0007“, voditelj: prof. dr. sc. Miloš Judaš.



HRZZ
Hrvatska zaklada za znanost



Hvala mentoru profesoru Goranu Šimiću na stručnom vodstvu, što mi je omogućio izradu ove disertacije, pružio priliku da učim i znao prepoznati trud.

Hvala svim vrijednim suradnicima iz kliničkih ustanova na trudu oko prikupljanja uzoraka. Hvala i svim pacijentima i njihovim obiteljima koji su pristali biti dio ovog istraživanja.

Hvala svim dragim kolegama, profesorima i prijateljima HIIM-ovcima na vrijednim savjetima, pomoći i veselim druženjima.

Hvala i dragim tehničarkama Danici, Maji i Božici na pomoći i nesebičnom dijeljenju znanja, čokolade i kave kad zagusti.

Hvala Mirjani na svemu što me naučila i što je uvijek bila spremna uputiti lijepu riječ podrške i motivirati sve oko sebe.

Hvala najboljoj ekipi iz labosa R-018 Lei, Klari, Dini i Mihaeli na pomoći, podršci i uvijek sjajnoj radnoj atmosferi.

Hvala mojoj obitelji na podršci kroz sve godine školovanja, na skuhanim gablecima, ljubavi i motivaciji koja me izgradila kao osobu. Hvala i svim prijateljima koji su bili spremni slušati dosadne priče gdje je zapelo.

Hvala mojem Luki za strpljenje, podršku i neizmjernu toleranciju.

I na kraju, hvala deda Iva, moja si vječna inspiracija.

SADRŽAJ

1. UVOD I SVRHA RADA 1
1.1. Alzheimerova bolest 1
1.2. Blagi kognitivni poremećaj 5
1.3. Imunosni odgovor CNS-a 6
1.4. Upala u Alzheimerovoj bolesti 8
1.4.1. Aktivacija mikroglije i patološke promjene amiloida β 9
1.4.2. Aktivacija mikroglije i neurofibrilarne promjene 10
1.4.3. Različiti fenotipovi mikroglija stanica 11
1.4.4. TREM2 receptor mikroglije 12
1.4.5. Upalni medijatori u Alzheimerovoj bolesti 13
1.4.6. Inflamasomi u patogenezi Alzheimerove bolesti 15
1.4.6.1. NLRP3 inflamasom u patogenezi Alzheimerove bolesti 15
1.4.6.2. NLRP1 inflamasom u patogenezi Alzheimerove bolesti 17
1.4.6.3. Mjerenje izvanstaničnog proteina ASC 18
1.4.7. Stečena imunost u Alzheimerovoj bolesti 18
2. HIPOTEZA 20
3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA 21
3.1. Opći cilj 21
3.2. Specifični ciljevi 21
4. MATERIJALI I METODE 22
4.1. Uzorak za imunohistokemijsku analizu 22
4.2. Uzorak za analizu likvora i plazmi 23
4.3. Metoda imunohistokemije 25
4.3.1. Primarna protutijela korištena za metode imunohistokemije i imunofluorescencije 25
4.3.2. Imunohistokemijska vizualizacija 25
4.3.3. Dvostruko bojanje metodom imunofluorescencije 27
4.3.4. Snimanje mikrofotografija 28
4.4. Bojanje metodom po Nisslu 28
4.5. Analiza imunohistokemijskih preparata 28
4.5.1. Analiza izražaja biljega mikroglije 29
4.5.2. Analiza izražaja biljega aktivacije inflamasoma 29
4.6. Enzimski povezana imunoapsorpcijska analiza – ELISA 30

4.7. Višestruka ELISA metoda 32
4.8. Statistička analiza.....35
5. REZULTATI 37
5.1. Izražaj biljega mikroglija stanica u hipokampalnoj formaciji.....37
5.1.1. IBA1.....38
5.1.2. HLA-DR 40
5.1.3. CD68.....43
5.2. Izražaj biljega aktivacije NLRP1 inflamasoma 46
5.3. Korelacije biljega aktivacije inflamasoma.....53
5.4. Korelacije biljega aktivacije mikroglije.....56
5.5. Analiza kolokalizacije biljega metodom dvostrukog bojanja imunofluorescencijom 58
5.6. Analiza koncentracija temeljnih biomarkera za Alzheimerovu bolest u likvoru……63
5.7. Analiza koncentracija sTREM2 u likvoru i plazmi 64
5.8. Analiza koncentracija ASC proteina u likvoru i plazmi 66
5.9. Analiza koncentracija citokina i kemokina u likvoru 68
5.10. Analiza koncentracija citokina i kemokina u plazmi 72
5.11. Korelacije koncentracije citokina i kemokina u likvoru s ostalim ispitivanim biljezima, dobi i brojem bodova na MMSE ljestvici……..74
6. RASPRAVA 76
6.1. Izražaj biljega mikroglija stanica u hipokampalnoj formaciji u kontrolnih, ispitanika s blagim spoznajnim poremećajem i ispitanika s Alzheimerovom bolesti.....76
6.2. Izražaj biljega aktivacije NLRP1 inflamasoma 77
6.3. Usporedba izražaja biljega aktivacije inflamasoma s dobi i spolom ispitanika.....79
6.4. Odnos aktivacije inflamasoma i mikroglije i neurofibrilarnih promjena.....80
6.5. Analiza kolokalizacije biljega metodom imunofluorescencije 81
6.6. Vrijednosti koncentracija TREM2 u likvoru i plazmi.....81
6.7. Vrijednosti koncentracija ASC proteina u likvoru i plazmi.....84
6.8. Vrijednosti koncentracija imunosnih medijatora u likvoru i plazmi.....86
7. ZAKLJUČCI 90
8. SAŽETAK 92
9. SUMMARY 93
10. LITERATURA 94
11. ŽIVOTOPIS ……....113

KRATICE

Aβ	Amiloid-beta
ABCA7	gen za *ATP binding cassette subfamily member 7*
AD	Alzheimerova bolest (*Alzheimer's disease*)
ADAM10	Protein 10 s disintegrin i metaloproteinaznom domenom (*A Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10*)
ADAM17	Protein 17 s disintegrin i metaloproteinaznom domenom (*A Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 17*)
ApoE	Apolipoprotein E
APP	Prekursorni protein amiloida (*Amyloid Precursor Protein*)
APC	Antigen prezentirajuće stanice (*Antigen presenting cells*)
ASC	*Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD*
bazični FGF	Bazični čimbenik rasta fibroblasta (*Fibroblast growth factor-basic*)
BBB	Krvno-moždana barijera (*Blood-brain Barrier*)
BIN1	Gen uključen u recikliranje endosoma (*Bridging Integrator 1*)
BSA	Goveđi serumski albumin (*Bovine Serum Albumin*)
β-NGF	Čimbenik rasta neurona beta (*Nerve growth factor beta*)
CASP-1	Kaspaza 1 (*Caspase 1*)
CASP-6	Kaspaza 6 (*Caspase 6*)
CD68	Diferencijacijski antigen mikroglija stanica (*clusters of differentiation*)
CERAD	*Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease*
CLU	Gen za klasterin (*Clusterin*)
CNS	Središnji živčani sustav (*Central Nervous System*)
CR1	Gen za receptor komplementa 1 (*Complement receptor type 1*)
CSF	Cerebrospinalna tekućina (*cerebrospinal fluid*)
CTACK	Kožni citokin koji privlači T stanice (*Cutaneous T-cell-attracting chemokine*)
CYP46A	Gen za kolesterol 24-hidroksilaza, iz skupine citokrom P450 enzima
CX3CL1	Fraktalkin, CX3 kemokin ligand 1 (*CX3 chemokine ligand 1*)
DAB	Diaminobenzidin
DAMP	Molekularni obrasci oštećenja (*Damage-Associated Molecules Pattern*)
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DSM-IV-TR	Dijagnostički I statistički priručnik za mentalne poremećaje (*Diagnostic and statistical manual of mental disorders*)

DTI	Difuzno oslikavanje (*diffusion tensor imaging*)
ELISA	Enzimski povezana imunoapsorpcijaska analiza (*Enzyme-linked immunosorbent assay*)
FTD	Frontotemporalna demencija (*Frontotemporal dementia*)
G-CSF	Stimulirajući čimbenik granulocita (*Granulocyte stimulating factor*)
GD	Gyrus dentatus
GM-CSF	Stimulirajući čimbenik granulocitno-makrofaznih kolonija (*Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*)
GRO-α	*Growth-regulated alpha protein*
GLIS1	Gen za glis protein (*Glis Family Zinc Finger 1*)
GSDMD	Gazdermin D
HC	Zdrave kontrole (*Healthy controls*)
HGF	Čimbenik rasta hepatocita (*Hepatocyte growth factor*)
HF	Hipokampalna formacija
HIV	Ljudski virus imunodeficijencije (*Human immunodeficiency virus*)
HLA-DR	Ljudski leukocitni antigen (*Human Leukocyte Antigen*)
HRP	Peroksidaza hrena (*Horseradish peroxidase*)
IBA1	Ionizirana kalcij-vezujuća adaptorska molekula 1 (*Ionized calcium Binding Adaptor molecule 1*)
IFN-α2	Interferon alfa 2
IFN-γ	Interferon gama
IL	Interleukin
IL-1rα	Antagonist receptora za interleukin 1 (*Interleukin 1 receptor antagonist*)
IL-2Rα	Alfa lanac receptora za interleukin 2 (*Interleukin -2 receptor alpha chain*)
IP-10	Protein 10 induciran interferonom gama (*Interferon gamma-induced protein 10*)
LBD	Demencija Lewyevih tjelešaca (*Lewy body dementia*)
LIF	Čimbenik inhibicije leukemije (*Leukemia inhibitory factor*)
LPS	Lipopolisaharid
MCI	Blagi kognitivni poremećaj (*Mild cognitive impairment*)
MCP-1	Protein 1 kemoatraktant monocita (*Monocyte chemoattractant protein 1*)
MCP-3	Protein 3 kemoatraktant monocita (*Monocyte chemoattractant protein 3*)
M-CSF	Čimbenik stimulacije kolonija makrofaga (*Macrophage colony-stimulating factor*)
MHC-II	Glavni kompleks tkivne podudarnosti (M*ajor histocompatibility complex*)
MIF	Čimbenik inhibicije migracije makrofaga (*Macrophage migration inhibitory factor*)

MIG	Monokin induciran interferonom gama (*Monokine induced by gamma interferon*)
MIP-1α	Upalni protein makrofaga 1 alfa (*Macrophage inflammatory protein 1 alpha*)
MIP-1β	Upalni protein makrofaga 1 beta (*Macrophage inflammatory protein 1 beta*)
MMSE	Kratko ispitivanje mentalnog statusa (*Mini Mental Status Examination*)
MRI	Slikovni prikaz magnetskom rezonancijom (*Magnetic Resonance Imaging*)
miRNA	mikro ribonukleinska kiselina (RNA) (*micro Ribonucleic acid*)
mROS	Mitohondrijske reaktivne kisikove vrste (*Mitochondrial reactive oxygen species*)
MS	Multipla skleroza
NAD+	*oxidized nicotinamide adenine dinucleotide*
NGS	Serum koze (*Normal Goat Serum*)
NfL	Neurofilament lakog lanca (*Neurofilament light chain*)
NFT	Neurofibrilarni snopići (*Neurofibrilary tangles)*
NIA	Nacionalni institut za starenje (*National Institute on Aging*)
NINCDS-ADRDA	*National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke and Alzheimer's Disease and Related Disorders Association*
NK stanice	Prirodnoubilačke stanice (*Natural killer cells*)
nNOS	Neuronalna sintetaza dušikovog oksida (*Neuronal nitric oxide synthase*)
NO	Dušikov oksid (*Nitric Oxide*)
NOD	Oligomerizacijska domena nukleotida (*Nucleotide oligomerization domain*)
NLRP	*Nucleotide-binding oligomerization domain, Leucine rich Repeat and Pyrin domain containing*
PAMP	Molekularni uzorci patogena (*Pathogen-Associated Molecules Pattern*)
PBS	Fosfatni pufer (*Phosphate Buffered Saline*)
PDGF-BB	Trombocitni čimbenik rasta BB (*Platelet derived growth factor BB*)
PET	Pozitronska emisijska tomografija (*Positron Emission Tomography*)
PICALM	Gen za fosfatidilinozitol vezujući protein za skupljanje klatrina (od eng. *Phosphatidylinositol Binding Clathrin Assembly Protein*)
PSEN1/2	Geni za presenilin
PQBP1	Gen za poliglutamin vezujući protein 1 (*Polyglutamine-binding protein 1*)
p-tau	Fosforilirani protein tau (*Phosphorylated tau protein*)
RANTES	*Regulated on Activation, Normal T cell Expressed and Secreted*
R47H	Varijanta *TREM2* gena
SCGF-β	Čimbenik rasta matičnih stanica beta (*Stem cell growth factor beta*)
SCF	Čimbenik matičnih stanica (*Stem cell factor*)

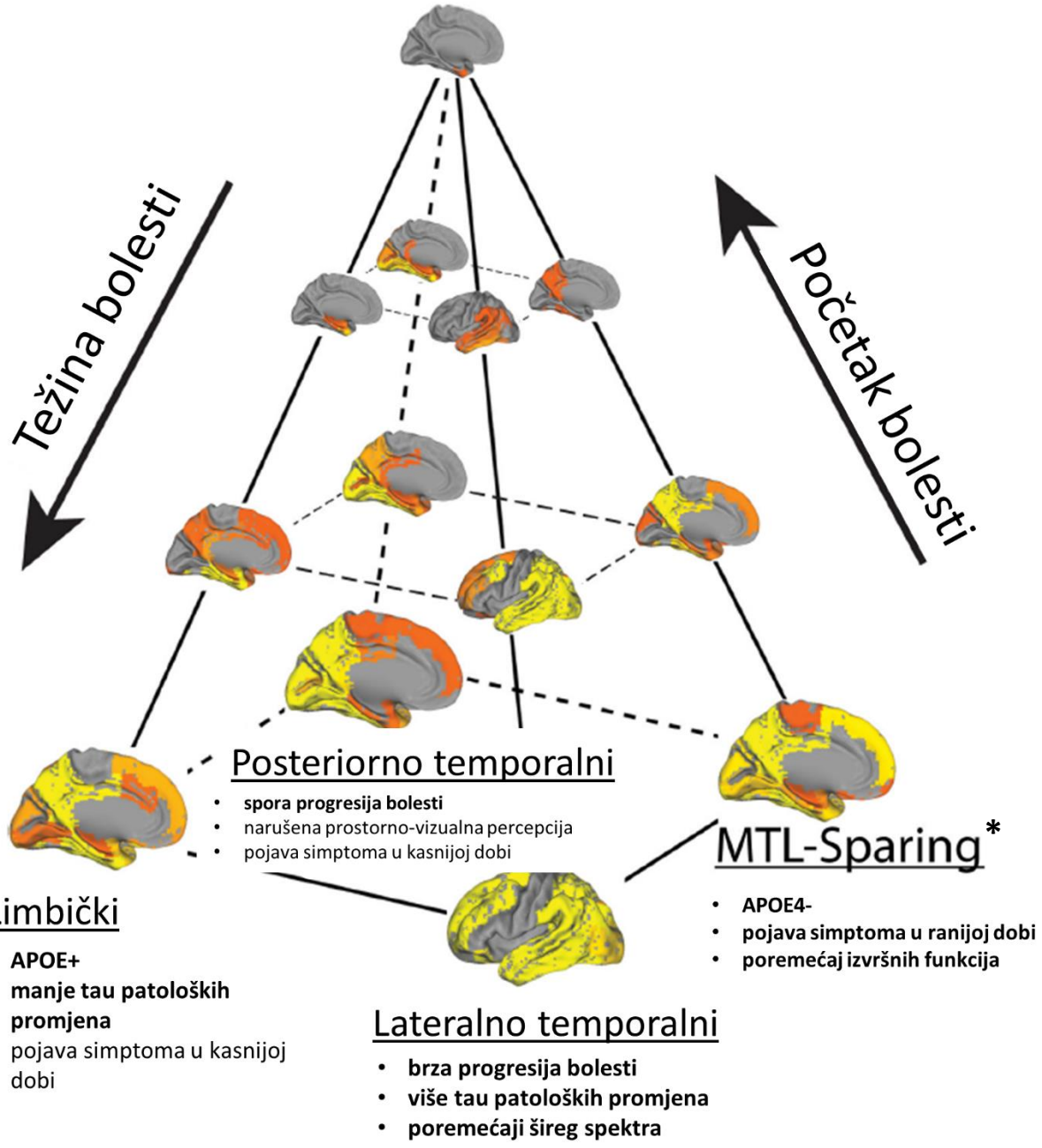
SDF-1α	Čimbenik 1 alfa stromalnih stanica (*Stromal cell-derived factor 1 alpha*)
SNAP-25	Protein povezan sa sinaptosomom (*synaptosomal-associated protein 25*)
SORL1	Gen za receptor za sortilin (*Sortilin Related Receptor 1*)
sTREM	topljivi TREM2 (*Soluble TREM2*)
SUB	subikulum
TDP-43	*transactive response element (TAR) deoxyribonucleic acid (DNA)-binding protein 43*
TGF-β	Transformirajući faktor rasta beta (*Transforming Growth Factor-β*)
TMB	3,3', 5,5; -tetramethylbenzidine
TNF-α	Faktor tumorske nekroze-alfa (*Tumor Necrosis Factor-α*)
TNF-β	Faktor tumorske nekroze-beta (*Tumor Necrosis Factor-β*)
TLR	*Toll-like receptors*
t-tau	Ukupni protein tau (*Total tau protein*)
TRAIL	*Tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand*
TBI	Traumatska ozljeda mozga *(Traumatic brain injury)*
TREM2	*Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells 2*
VEGF	Čimbenik rasta endotela krvnih žila (*Vascular endothelial growth factor*)
VILIP-1	Vizininu sličan protein 1 (*Visinin like protein 1*)
WM	Bijela tvar (*White matter*)
YKL-40	Protein 1 nalik hitinazi 3 (*Chitinase 3-like protein 1*)

1. UVOD I SVRHA RADA

1.1. Alzheimerova bolest

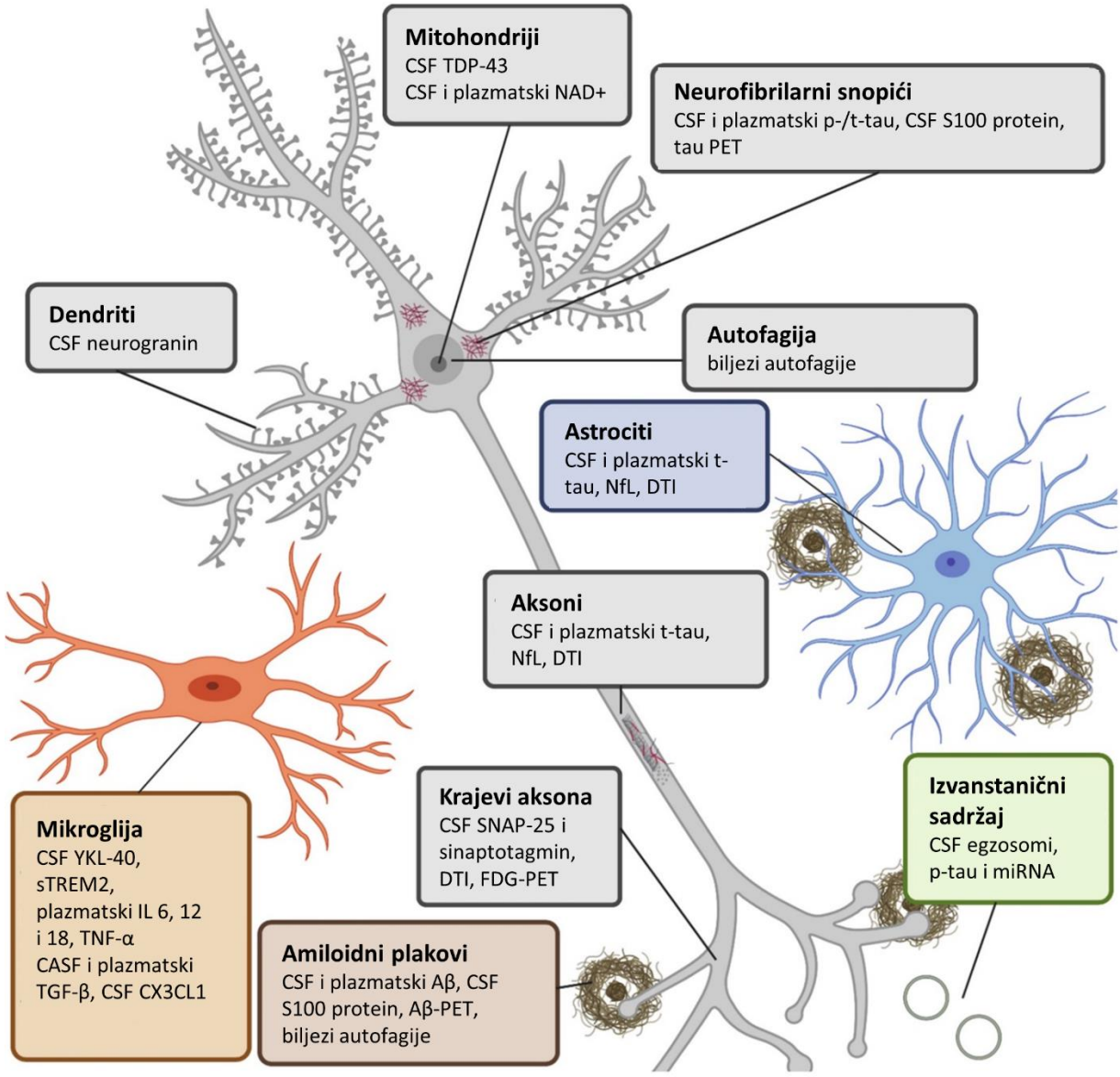
Alzheimerova bolest (*Alzheimer's disease*, AD) najčešći je primarni uzrok sindroma demencije i predstavlja sve veći javnozdravstveni problem u cijelom svijetu (1). Podaci iz 2018. godine govore da je te godine od AD-a u svijetu bolovalo oko 50 milijuna ljudi (2). Projekcije Svjetske zdravstvene organizacije predviđaju da će se broj oboljelih u svijetu do 2050. godine otprilike utrostručiti (2). Radi se o neizlječivoj neurodegenerativnoj bolesti u tijeku koje uglavnom dolazi do sporoprogresivnog propadanja sinapsi i odumiranja neurona što dovode do urušavanja spoznajnih sposobnosti, gubitka najprije kratkoročnog, a zatim i dugoročnog pamćenja te radne sposobnosti (3). Napredovanjem bolesti oboljeli uobičajeno nakon nekoliko godina dosegnu stadij u kojem više nisu u mogućnosti samostalno obavljati svakodnevne aktivnosti te su u potpunosti ovisni o pomoći skrbnika i njegovatelja (4). Glavna neuropatološka obilježja AD-a su nakupljanje pogrešno smotanih proteina amiloida β (Aβ) u obliku difuznih izvanstaničnih nakupina topljivog amiloida i amiloidnih plakova te proteina tau u obliku neurofibrilarnih snopića (*neurofibrillary tangles*, NFT), odumiranje neurona te snažna upala u središnjem živčanom sustavu (*central nervous system*, CNS) (5). Najvažniji rizični čimbenik za nastanak AD-a je starenje, ali točan uzrok ili uzroci bolesti još uvijek nisu poznati. Razlikujemo dva osnovna tipa AD-a, nasljednu ili AD s ranim početkom te češći, sporadični tip bolesti (6). Nasljedni oblik bolesti nasljeđuje se autosomno dominantno, a uvjetovan je prisutnošću neke od mutacija u genima za amiloid prekursorni protein (*APP*), presenilin 1 (*PSEN1*) i presenilin 2 (*PSEN2*). Mutacije navedenih gena dovode do poremećaja metabolizma APP-a na način da se povećava stvaranje, a zatim i oligomerizacija Aβ peptida koji se zatim nakuplja u obliku izvanstaničnih amiloidnih plakova (6). Zanimljivo je da je pronađena i vrlo rijetka mutacija gena *APP* koja uvelike smanjuje rizik nastanka AD-a te pojave kognitivnih smetnji (7). Velika većina bolesnika s AD-om ima tzv. sporadični oblik bolesti u čiji nastanak je uključeno puno različitih čimbenika čiji učinci vjerojatno mogu biti aditivni, te u različitoj mjeri doprinositi razvoju neuropatoloških promjena. Iako razvoj bolesti u tom slučaju nije uvjetovan nekom točno određenom mutacijom navedenih triju gena, to nipošto ne znači da nastanak sporadičnog oblika bolesti nema gensku podlogu. Štoviše, studija iz 2006. godine u kojoj je analizirano 11884 parova blizanaca procijenila je da nasljednost sporadičnog oblika bolesti iznosi 58-79% (8). Naime, otkriveno je puno gena čije pojedine varijante povećavaju rizik za

obolijevanje od AD-a. Neki od tih gena povezani su s metabolizmom kolesterola (*ABCA7*, *CYP46A*), recikliranjem endosoma (*BIN1*, *PICALM*, *SORL1*), te reakcijama imunosnog sustava (*CLU*, *CR1*, *TREM2*) (9). Daleko najveći rizik za nastanak sporadičnog oblika imaju nositelji ε4 varijante *APOE* gena (10). Trenutno je glavna paradigma da proteinski produkt toga gena ima ključnu ulogu u održavanju metabolizma lipida, posebice dopremanju kolesterola u stanice, a sudjeluje i u metabolizmu glukoze i upalnim procesima u mozgu (11). Za razliku od difuznih depozita amiloida i amiloidnih plakova čija brojnost i raspodjela nisu u korelaciji s kliničkom slikom niti napredovanjem bolesti, brojnost i distribucija NFT-a izvrsno koreliraju sa simptomatologijom, te kliničkom slikom i progresijom AD-a (12,13). Temeljem histopatoloških bojanja promjena tau proteina dokazano je da postoji šest različitih stadija širenja neurofibrilarne patologije (12). Patološke promjene proteina tau u AD-u u najčešćem, limbičkom podtipu bolesti, najprije se javljaju u transentorinalnoj i entorinalnoj moždanoj kori iz koje se šire medijalno prema hipokampalnoj formaciji i lateralno prema sljepoočnom izokorteksu. U sljedećem stadiju patološke promjene tau proteina zahvaćaju sljepoočnu, tjemenu i čeonu moždanu koru, dok su primarna (idiotipska) polja motoričke, somatosenzoričke i vidne moždane kore zahvaćena neurofibrilarnim promjenama tek u posljednjem stadiju bolesti. Topografska progresija bolesti praćena je odgovarajućim promjenama kognitivnog statusa (12). Upotreba pozitronske emisijske tomografije (*positron emission tomography*, PET) proteina tau pokazala je da uzorak širenja tau patoloških promjena i nije toliko konzistentan u populaciji oboljelih (14). Prikazan je model varijacija širenja tau patoloških promjena te su prema rezultatima dobivenima upotrebom algoritama strojnog učenja i prepoznavanja obrazaca širenja predložena četiri podtipa AD-a u kojima patološke promjene započinju i šire se kroz različite kortiko-limbičke puteve, različitom brzinom te ih karakterizira drugačiji biološki profil bolesti, klinička slika i težina simptoma (**Slika 1**) (14).



Slika 1. Model varijacija u širenju tau patoloških promjena. Opisane su karakteristike svakog podtipa, masno otisnuti tekst predstavlja karakteristike po kojima se svaki podtip značajno razlikuje od ispitanika koji ne pokazuju tau patološke promjene. * Podtip u kojem medijalni dio temporalnog režnja nije zahvaćen promjenama proteina tau (*medial temporal lobe sparing*, MTL-sparing). Preuzeto i prilagođeno iz: Vogel i sur. 2021. (14)

Veliki problem u dijagnostici i liječenju AD-a je mogućnost postavljanja dijagnoze tek s pojavom prvih simptoma, kada se može jedino pokušati terapijski utjecati na usporavanje tijeka bolesti kolinomimeticima i memantinom. Smatra se da prve patološke promjene u AD-u započinju i dvadesetak do tridesetak godina, a prema Braaku i Del Tredici i četrdesetak godina prije pojave prvih simptoma (15). Stoga je jedan od bitnih ciljeva što ranije dokazati pokazatelje patofizioloških procesa kako bi se pravovremenom intervencijom moglo usporiti ili prevenirati daljnji tijek bolesti. Uz detaljan neurološki pregled i neuropsihološko testiranje, kao temelj za ranije i točnije postavljanje dijagnoze AD-a, često se upotrebljava A/T/N sustav procjene biomarkera (16). „A" kategorija predstavlja pokazatelje patoloških promjena Aβ-a, Aβ-PET ili koncentracija $A\beta_{1-42}$ u likvoru. Smanjene koncentracije $A\beta_{1-42}$ u likvoru vjerojatni su pokazatelj većeg stupnja nakupljanja amiloida u obliku plakova. „T" se odnosi na mjerenja pokazatelja patoloških promjena proteina tau, napose koncentracije fosforiliranog proteina tau (p-tau181 i p-tau217) u likvoru i tau-PET snimanje. Posljednja „N" kategorija biomarkera predstavlja pokazatelje neurodegenerativnih procesa što se promatraju putem mjerenja koncentracije ukupnog proteina tau (t-tau) u likvoru, te neuroslikovnih biomarkera, PET snimanja energijskog metabolizma pomoću fluorodeoksi-glukoze (FDG-PET), kao i strukturne magnetske rezonancije (*magnetic resonance imaging*, MRI) kojom je moguće precizno kvantificirati atrofiju pojedinih dijelova mozga (16). Sve više se napora ulaže kako bi se pronašli i drugi korisni biomarkeri, a neki od potencijalno najosjetljivijih i najspecifičnijih su Vizininu-sličan protein 1 (*visinin-like protein 1*, VILIP-1) (17), neurofilament lakog lanca (*neurofilament light chain*, NfL) (18), kao i pokazatelji upalnih procesa u CNS-u poput koncentracija različitih citokina i kemokina (19,20), topljivi oblik TREM2 (sTREM2) (21), Hitinazi-3-slični protein 1 (*chitinase-3-like protein 1*, YKL-40) i drugi (22,23). Neki od patoloških procesa u AD-u koji se mogu otkriti mjerenjem pojedinih biljega prikazani su shematski na **Slici 2** (24). Zbog čestih kontradiktornih rezultata, uz standardne $A\beta_{1-42}$, t-tau i p-tau, još uvijek nisu pronađeni visoko pouzdani novi biljezi koji bi pospješili postavljanje dovoljno rane dijagnoze AD-a koja bi omogućila učinkovito modificiranje, odnosno usporavanje ili sprječavanje napredovanja bolesti.



Slika 2. Prikaz struktura i molekularnih procesa koji su patološki promijenjeni u AD-u i mogu se detektirati mjerenjem navedenih biljega. Preuzeto i prilagođeno iz: Bjorkli i sur. 2020. (24)

1.2. Blagi kognitivni poremećaj

Petersen i suradnici još su 1997. godine prvi puta definirali blagi spoznajni poremećaj (*Mild cognitive impairment*, MCI) kao kognitivni poremećaj koji se može smatrati prijelaznim stadijem između normalnog (uobičajenog) starenja i razvoja sindroma demencije (25). Činjenica da patološke promjene koje dovode do kognitivnih poremećaja započinju mnogo godina prije pojave

prvih simptoma te neuspjesi dosadašnjih pokušaja liječenja AD-a stavili su MCI u sve veći fokus istraživanja s ciljem da se pronađu pouzdani rani pokazatelji mogućih ranih patoloških stanja, kao i terapijske intervencije koje bi usporile ili spriječile progresiju prema demenciji (26). Neuropatološki, u MCI stadiju su objektivno mjerljive promjene volumena i metaboličke aktivnosti pojedinih dijelova velikog mozga, ali i promjene koncentracija likvorskih biljega AD-a (26). Općenito gledajući, MCI je karakteriziran smanjenom sposobnošću prisjećanja i učenja novih informacija (amnestički podtip MCI-ja), ali definirani su i drugi podtipovi MCI-ja u kojima su oštećene neke druge kognitivne domene (govor, pozornost, izvršno i socijalno funkcioniranje, vidno-prostorna percepcija) (26, 27). Ranije se smatralo da je MCI isključivo asimptomatski rani stadij AD-a, no danas znamo da postoji i značajan broj bolesnika koji s vremenom progrediraju u neki drugi oblik demencije (frontotemporalna demencija; *frontotemporal dementia*, FTD ; bolest Lewijevih tjelešaca; *Lewy body dementia*, LBD, kao i sindroma demencije zbog nakupljanja drugih patoloških proteina poput RNA-vezujućeg proteina TDP-43 i GRN proteina (progranulina), a kod nekih se uopće ne razvije teži oblik bolesti (28).

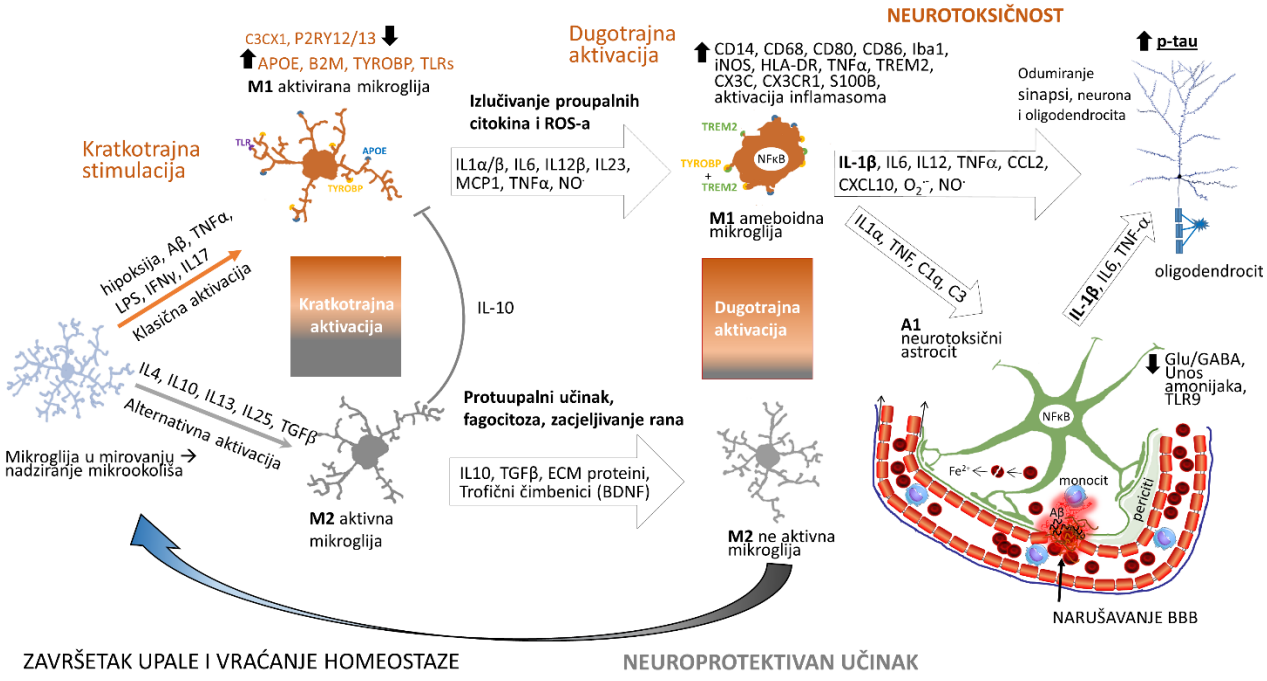
1.3. Imunosni odgovor CNS-a

Iako se ranije smatralo da je CNS u potpunosti odvojen od imunosnih zbivanja u perifernim tkivima, danas se zna da imunosne stanice s periferije cirkuliraju kroz limfni sustav velikog mozga (29). Subarahnoidni prostor te moždani ventrikuli ispunjeni su likvorom i imaju dobro uspostavljene puteve drenaže kojima su povezani s imunosnim sustavom perifernih tkiva, za razliku od toga, parenhim mozga jače je zaštićen te je komunikacija s drugim imunosnim stanicama uvelike limitirana (30). Krvno-moždanu barijeru (*Blood-brain barrier*, BBB) pored nožica astrocita (*glia limitans*) i bazalne membrane tvore i endotelne stanice krvnih žila koje su međusobno povezane čvrstim spojevima te je na taj način ulazak tvari i stanica prema neuronima strogo ograničen (30). U području postkapilarnih venula, bazalne membrane tvore perivaskularni prostor u kojem se često nalaze antigen prezentirajuće stanice (*Antigen presenting cells*, APC), najčešće dendritičke stanice, te se događa ekstravazacija imunosnih stanica. Patogeni u mozak najčešće ulaze u području cirkumventrikularnih organa ili ovojnica gdje krvne žile imaju povećano propusnu BBB ili ona u potpunosti nedostaje (30). Infekcija patogenima ili ozljeda pokreću kaskadu lokalnih i sistemskih događaja te se razvija upala. Ona započinje lučenjem pro-upalnih

citokina, najprije interleukina skupine 1 (IL-1α, IL-1β, IL-18) koji dalje potiču lučenje faktora tumorske nekroze α (*Tumor necrosis factor*, TNF-α) i IL-6, privlačenje i proliferaciju T i B limfocita (31). Mikroglija stanice najbrojnije su imunološke stanice u mozgu. To su stanice urođenog imunološkog sustava, pripadaju mijeloidnoj lozi, a naseljavaju CNS još tijekom embrionalnog razvoja (32). Stanice urođene imunosti posjeduju receptore slabije specifičnosti koji služe za prepoznavanje molekularnih uzoraka patogena (*Pathogen associated molecular patterns*, PAMPS) i oštećenih stanica (*Damage associated molecular patterns*, DAMPS), za razliku od stanica stečene imunosti koje prepoznaju visoko specifične antigene, proizvode specifična protutijela te stvaraju stanice koje pamte susret s određenim antigenom kako bi imunosni odgovor u idućem doticaju s njim bio brži i učinkovitiji (31). Mikroglija stanice u stanju homeostaze visoko su razgranate stanice koje svojim nastavcima nadziru stanje moždanog parenhima. Ukoliko prepoznaju neki od opasnih signala prolaze proces aktivacije. Aktivacijom mikroglija poprima ameboidni oblik i mijenja izražaj površinskih receptora, potiče razvoj upale i eliminaciju patogena ili oštećenih stanica (33). Osim mikroglije u upalnom odgovoru u CNS-u sudjeluju i astrociti, endotelne stanice te ostale imunološke stanice s periferije uključujući i stanice stečene imunosti, posebice u upalnim bolestima CNS-a ili virusnim infekcijama (34,35). Povezanost imunološkog sustava cijelog organizma potvrđuju i nalazi da sistemska upala utječe na aktivnost živčanog sustava i može uzrokovati upalu u CNS-u (36,37), a postmortalna analiza mikroglije mlađih ljudi koji su za života imali sistemsku upalu pokazala je da mikroglija pokazuje fenotip sličan fenotipu kakav se vidi kod starijih ljudi i oboljelih od velikog neurokognitivnog poremećaja (tj. sindroma demencije) (36). Povišene koncentracije upalnih citokina u CNS-u povezane su sa smanjenjem kognitivnih sposobnosti (38). Patološke promjene ili promjene uzrokovane starenjem ili nekom kroničnom bolesti mogu utjecati na reaktivnost stanica imunološkog sustava te promijeniti njihove obrasce aktivacije. Stanice tada mogu postati prekomjerno reaktivne i umjesto zaštitnog učinka mogu djelovati štetno po okolno tkivo i poticati progresiju bolesti (39,40).

1.4. Upala u Alzheimerovoj bolesti

Uz poremećen metabolizam Aβ-a te hiperfosforilaciju i agregaciju proteina tau, upala je jedno od glavnih patoloških obilježja AD-a (34), a mikroglija stanice ključni su posrednici upalnih procesa u mozgu. Neuroprotektivnu ulogu mikroglija može ostvariti jedino pravovremenom i kontroliranom reakcijom, ali tijekom starenja ili neurodegenerativnih procesa mikroglija može postati i kronično aktivirana i učiniti više štete nego koristi (33,41). Genski poliformizmi koji se povezuju s većim rizikom za nastanak AD-a nađeni su u genima koji kodiraju citokine, receptore ili druge proteine uključene u djelovanje mikroglije, poput gena *OAS1*, *LAPTM5*, *LILRB4*, *ITGAM*, *TREM2* i drugih (42, 43). U AD-u se mikroglija aktivira u prisutnosti patološki promijenjenih proteina, kako Aβ-a, tako i tau proteina (44–49), a na **Slici 3** prikazana je kompleksnost upalnog odgovora te međuovisnost aktivacije mikroglije i neurodegenerativnih promjena u AD-u.



Slika 3. Shematski prikaz upalnog odgovora te međuovisnost aktivacije mikroglije i neurodegenerativnih promjena u AD-u. Prilagođeno i preuzeto iz: Šimić i sur. 2019. (50)

1.4.1. Aktivacija mikroglije i patološke promjene amiloida β

Mikroglija aktivnog fenotipa nakuplja se oko amiloidnih plakova (51), a aktivacija je praćena i nakupljanjem slobodnih radikala te proupalnih medijatora (51). Istraživanje u transgeničnih animalnih modela AD-a pokazalo je da su koncentracije pro-upalnih citokina veće u mozgu s izraženim patološkim promjenama AD-a u usporedbi sa zdravim kontrolama (52). Koncentracije upalnih citokina pozitivno koreliraju s razinama topljivih i netopljivih oblika Aβ-a što je pokazatelj da je Aβ vjerojatno jedan od glavnih pokretača upale u AD-u (52). Aktivacija mikroglije Aβ-om dokazana je i u kulturi mikroglije štakorsog mozga (53). Mikroglija tretirana Aβ-om morfološki se mijenja te povećano luči upalne citokine i u kulturi zajedno s neuronima tako aktivirana uzrokuje odumiranje neurona (53). Aktivacija mikroglije potrebna je kako bi se potaklo uklanjanje viška nakupljenog amiloida budući da mikroglija aktivno sudjeluje u njegovu uklanjanju (54). S napredovanjem AD-a i sve jačom aktivacijom glije stvara se začarani krug gdje snažna upala dalje potiče patološke promjene Aβ-a te se na taj način narušava balans uklanjanja i nastajanja amiloidnih plakova (51). Odgovor mikroglije uvjetovan je i oblikom Aβ peptida (55). Za razliku od topljivog oblika Aβ, dodatak Aβ fibrila u kulturi ne izaziva otpuštanje upalnih citokina, što znači da najranije promjene strukture amiloida mogu uzrokovati značajnu aktivaciju mikroglije te da je upala prisutna već u vrlo ranom stadiju AD-a (55,56). Druga studija pokazala je da i oligomeri i fibrili mogu izazvati aktivaciju mikroglije, ali i da ti različiti oblici peptida potiču aktivaciju različitih upalnih profila mikroglije (56). Fibrili za razliku od oligomera puno jače potiču fagocitozu mikroglije dok oligomeri, osim što izazivaju snažnije otpuštanje proupalnih citokina i slobodnih radikala inhibiraju fagocitozu fibrila. Pokazano je i da lučenje proupalnih citokina i oksidacijski stres izazvani lipopolisaharidom (*lippolysaccharide*, LPS) negativno koreliraju s fagocitnom sposobnosti mikroglije (44). Učinci oligomera Aβ-a na aktivaciju mikroglije te njihova mikroglijom posredovana neurotoksičnost može biti regulirana preko posebnog kalijevog kanala (45) ili pak razinom ekspresije biglikana u mikrogliji, pa se misli da bi različiti blokatori K^+ kanala ili aktivnosti biglikana mogli biti potencijalni regulatori aktivacije mikroglije posredovane Aβ-om (45,57).

1.4.2. Aktivacija mikroglije i neurofibrilarne promjene

Poznato je da se mikroglija aktivira u prisutnosti patološki promijenjenog proteina tau (47, 48, 58–60), a povećani broj NFT-a negativno korelira s kognitivnim sposobnostima osoba s AD-om (61). Analiza aktivacije mikroglije u mozgu čovjeka i mozgu transgeničnog miša kojemu je dodan tau (*MAPT*) gen čovjeka, potvrdila je prisutnost aktivirane mikroglije u blizini neurona s neurofibrilarnim promjenama (58), a u netransgeničnom štakorskom modelu inokulacija nepravilno smotanog tau proteina čovjeka uzrokovala je morfološke promjene mikroglije i uvjetovala promjenu izraženosti njihovih površinskih receptora (46). Jedna nedavno objavljena studija otkriva da mikroglija registrira promijenjene tau proteine putem poliglutamin vezujućeg proteina 1 (*polyglutamine binding protein 1*, PQBP1), što dovodi do njezine aktivacije i inicira upalno stanje (60). Primjena flavonoida rutina u mišjem modelu tauopatije smanjila je aktivaciju proupalnih puteva, lučenje proupalnih citokina te prekomjernu fagocitozu sinapsi. Koncentracije patološki promijenjenog tau značajno su se smanjile što je uzrokovalo i poboljšanje kognitivnih sposobnosti (62). Rutin je sličan učinak imao i u *in vitro* modelu uz značajno povećanje učinkovitosti unosa promijenjenog proteina tau u mikrogliju (62). Osim što neurofibrilarne promjene potiču aktivaciju mikroglije, postoje dokazi i da upalni procesi mogu prethoditi nastanku tau patoloških promjena (63,64). Kada odgovor mikroglije nije pravilno reguliran, na primjer primjerenom izraženošću receptora fraktalkina ili TREM2 receptora (*Triggering receptor expressed on myeloid cells 2*), javlja se povećana hiperfosforilacija i agregacija proteina tau (65–67). Pojačano lučenje upalnog citokina IL-1 pogoduje jaču fosforilaciju proteina tau (64), dok utišavanje upale u mišjem modelu tauopatije ublažava štetne učinke patološki promijenjenog proteina tau (63). S progresijom bolesti neurofibrilarne promjene šire se anterogradnim projekcijama prema sličnom obrascu, pa je predložena hipoteza o širenju hiperfosforiliranog proteina tau prema načelima sličnima prionskim bolestima (68,69). Mnogo je mogućih razloga za spomenuto topografsko širenje tau patoloških promjena, a neke studije ističu da mikroglija može posredovati širenje toksičnih klica proteina tau (*tau seeds*) (70,71). Mikroglija fagocitozom nastoji ukloniti pogrešno smotane oblike proteina tau no ukoliko njihova razgradnja nije uspješna izbacuju se iz stanice „pakirani“ u egzosome (71). Okolne stanice, napose neuroni, toksične tau oblike dopremljene egzosomima mogu aktivno unositi što nadalje može uzrokovati promjene dosad intaktnih proteina tau (70). Eksperimentalno uklanjanje mikroglije *in vitro* i *in vivo* smanjilo je širenje patoloških promjena taua (70).

1.4.3. Različiti fenotipovi mikroglija stanica

Slično kao i opisana polarizacija makrofaga (31) često se i za aktivaciju mikroglije koriste termini M1 i M2 fenotipa (72). Spomenuli smo da mikroglija tijekom procesa aktivacije mijenja izražaj površinskih receptora, morfologiju, ali i profil medijatora koje luči. Kao odgovor na ozljedu tkiva ili infekciju, mikroglija započinje proces klasične aktivacije odnosno eksprimira M1 ili upalni fenotip. „Zadaća" M1 mikroglije je poticanje upale i eliminacija patogena pa započinje lučenje proupalnih citokina i slobodnih radikala (72). Da bi se nakon što je opasnost uklonjena povratila homeostaza, potrebno je utišati upalu. Ulogu u uklanjanju odumrlih i oštećenih dijelova stanica te stišavanju upale ima M2 ili protuupalni fenotip. Polarizacija mikroglije prema M2 fenotipu izuzetno je bitna jer lučenje protuupalnih citokina (IL-4, IL-10 i IL-13) sprječava daljnje napredovanje i širenje upale (72). Smatra se da tijekom nastanka neurodegenerativnih bolesti mikroglija češće eksprimira upalni M1 fenotip te da je uzrok nastanka i progresije bolesti neprimjeren izražaj M1 i M2 fenotipa (33). Taj koncept pomalo je pojednostavljen i zastario prikaz aktivacije mikroglije te se sve više ističe postojanje spektra različitih fenotipova ovisno o stanju ili bolesti CNS-a. Analiza mikroglije mišjeg modela te oboljelih od AD-a otkrila je postojanje fenotipa mikroglije specifičnog za neurodegenerativne bolesti. Taj fenotip karakterizira povećana ekspresija gena specifičnih za AD te je nazvan DAM (*Disease assocciated microglia*, DAM) (73). Dodatne transkriptomske analize pokazale su da i DAM mikroglija može eksprimirati pro- i protuupalni fenotip te da utišavanjem proupalnog DAM fenotipa može imati potencijal za terapijsku intervenciju u AD-u (74). Meta-analiza transkriptoma mikroglije i mijeloidnih stanica za 69 različitih stanja (neurodegeneracija, ishemija, upalne bolesti, tumori, demijelinacija, tauopatije) otkrila je postojanje najmanje sedam različitih skupova gena čija je ekspresija regulirana zajedno, a karakteristični su za procese proliferacije, neurodegeneracije, stimulaciju interferonom ili endotoksinom. To je potvrda činjenice da mikroglija može izražavati puno širi spektar fenotipova ovisno o specifičnom stanju mikrookoliša u kojem se nalazi (75). Jedna novija studija ističe postojanje različitih fenotipova mikroglije u AD-u od kojih jedan korelira s patološkim promjenama Aβ-a, a drugi s neurofibrilarnim promjenama (76). Taj nalaz ukazuje da se aktivacijski profili mikroglije u istoj bolesti mogu razlikovati u ovisno o stadiju i vrsti patoloških promjena.

1.4.4. TREM2 receptor mikroglije

TREM2 receptor mikroglije često se istražuje u kontekstu uključenosti u nastanak AD-a, ponajviše zbog varijanti *TREM2* gena čiji nositelji imaju veći rizik za obolijevanje (21). R47H varijanta nosi najveći rizik za obolijevanje od AD-a od svih *TREM2* varijanti te je po učestalosti drugi rizični polimorfizam, odmah nakon ε polimorfizma *APOE* gena (10). Iako sve uloge TREM2 receptora još uvijek nisu poznate, zna se da je važan za interakciju s apolipoproteinima, Aβ-om, te sudjeluje u regulaciji broja mijeloidnih stanica i u nadzoru fagocitoze i upalnog odgovora (21,77). U kontekstu AD-a, neka su istraživanja pokazala zaštitni učinak povećane ekspresije TREM2 receptora (78). Veći izražaj TREM2 može značiti učinkovitiju fagocitozu (78,79), a istodobno s tim nalazom dokumentirana je i smanjena ekspresija nekih gena važnih za aktivaciju mikroglije (80). Mikroglija s eksprimiranom R47H varijantom *TREM2* gena ima smanjenu mogućnost aktivacije inflamasoma uslijed vezanja liganda na TREM2 receptor (81). Povećana ekspresija TREM2 u makrofaga inhibira aktivaciju inflamasoma (82), dok nedostatak TREM2 značajno pojačava piroptozu makrofaga (83). Suprotno tome, zabilježeno je da nedostatak TREM2 u makrofaga mišjeg modela AD-a smanjuje upalu te ublažava nastanak patoloških promjena Aβ-a i proteina tau (84). Slično tomu, mikroglija aktivirana visokim koncentracijama glukoze povećava ekspresiju TREM2 i lučenje proupalnih citokina a utišavanje TREM2 gena smanjuje upalu izazvanu visokim koncentracijama glukoze (85). Izvanstaničnu domenu TREM2 receptora cijepaju disintegrin i metaloproteinaze ADAM10 i ADAM17 (86). Još uvijek nije jasna uloga topljivog oblika TREM2 (soluble TREM2, sTREM2), no čini se da može poticati preživljavanje mikroglije i lučenje proupalnih citokina (87). Analizom koncentracija sTREM2 u likvoru uočen je njegov porast kod oboljelih od AD-a, no u nekim studijama taj rezultat nije ponovljen (88). U nekolicini je istraživanja uočena dinamika promjena koncentracija TREM2 u likvoru u ovisnosti o stadiju bolesti: najčešće je zamijećen najveći porast u ranim simptomatskim stadijima. Zanimljivo, porast TREM2 također pozitivno korelira s koncentracijama fosforiliranog i ukupnog tau proteina, dok su uz porast pokazatelja patoloških promjena amiloida zabilježene niže koncentracije TREM2 u likvoru (21, 88-91). Veća aktivnost mikroglije mogla bi imati zaštitni učinak na nakupljanje Aβ-a u AD-u jer su povišene koncentracije TREM2 u likvoru ukazivale na slabiji Aβ-PET signal (79). Zbog svega navedenog, sTREM2 mogao bi biti koristan kao dijagnostički marker stanja, ali za to je potrebno napraviti više studija s još većim brojem ispitanika i ujednačenim preanalitičkim i analitičkim postupcima analize. Našim istraživanjem pokušat ćemo

dodatno razjasniti povezanost koncentracija sTREM2 u likvoru i plazmi s patološkim promjenama u AD-u.

1.4.5. Upalni medijatori u Alzheimerovoj bolesti

Mnogobrojni pregledni članci ukazuju na drugačije uloge pojedinih citokina u patogenezi AD-a (41, 92, 93). Povećane koncentracije proupalnih citokina (IL-1, TNF-α, IL-6, IL-18) pojačavanjem upalnog odgovora u AD-u mogu utjecati na pogoršanje patoloških promjena i ubrzavati napredovanje bolesti (92, 93). Ističe se dvojaka uloga TNF-α u patogenezi AD-a. Budući da TNF-α utječe na migraciju imunosnih stanica i da njegova pojačana aktivnost potiče veći stupanj nakupljanja Aβ, utišavanje signalizacije TNF-α smanjilo je aktivaciju mikroglije i posljedično dovelo do poboljšanja kognitivnih sposobnosti (41). Suprotno tome, izražaj TNF-α u hipokampusu transgeničnog mišjeg modela uzrokuje snažnu aktivaciju mikroglije i posljedično smanjenje veličine i broja amiloidnih plakova (94). IL-1β glavni je proupalni citokin koji potiče lučenje kaskade ostalih citokina te promovira upalni odgovor (31). Koncentracije IL-1β povišene su u hipokampusu i prefrontalnoj moždanoj kori oboljelih od AD-a. Njegove povećane koncentracije u MCI-ju pokazuju da se upalni procesi aktiviraju vrlo rano u tijekom bolesti (41). Slično kao i TNF-α, IL-1β pokazuje pozitivan učinak na uklanjanje viška Aβ-a u mišjem modelu AD-a (92). Neke druge studije pokazale su kontradiktorne rezultate te ukazuju na štetni učinak povećane ekspresije IL-1β u AD-u (64,95). Djelovanje IL-6 u AD-u uglavnom se pokazalo štetnim: npr. u hipokampusu je u blizini plakova izražaj IL-6 bio pojačan i utjecao je na hiperfosforilaciju proteina tau (93). IL-18 citokin je također proupalni citokin koji svojim djelovanjem stimulira lučenje drugih citokina i privlači upalne stanice (31). Pokazano je da je njegova koncentracija povećana u mozgu oboljelih od AD-a te da je porast IL-18 u negativnoj korelaciji s narušavanjem kognitivnih sposobnosti (92). Dodatak IL-18 u kulturi neurona diferenciranih iz SH-SYS5 stanica povećava nakupljanje Aβ (96) te uzrokuje hiperfosforilaciju proteina tau (97). Za razliku od oprečnih rezultata oko utjecaja pojačane upale na nastanak patoloških promjena Aβ, dosadašnja istraživanja pokazuju uglavnom štetan utjecaj pojačane ekspresije gotovo svih istraživanih proupalnih citokina na razvoj patoloških promjena tau proteina (92). Pregledna studija ističe da su u AD-u osim povišenih koncentracija proupalnih citokina, neka istraživanja zabilježila i povećanje koncentracije protuupalnih (41) kao odgovor na pojačanu upalu. Iako utišavanje upale može djelovati protektivno na razvoj patoloških

promjena u AD-u, često se ističe da previsoke koncentracije protuupalnih citokina mogu izazvati suprotan učinak smanjujući fagocitnu sposobnost mikroglije (41,92,93). Sve više se istražuje biomarkerski potencijal koncentracija različitih citokina u tjelesnim tekućinama u AD-u, ali iz dosad objavljenih rezultata koncentracije različitih citokina i kemokina izmjerene uglavnom pojedinačnim ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA) kitovima u MCI i AD pokazuju preveliku varijabilnost da bi imali veći prognostički značaj (20,98). Ipak, neke podskupine citokina (IL-1β, IL-6, TNF-α) pokazuju blagi porast s napredovanjem AD-a, dok druge (IL-18, *Monocyte chemoattractant protein-1*, MCP-1, *interferon gamma inducible protein 10*, IP-10) najviše vrijednosti dostižu u ranim stadijima AD-a. Osim toga, brojni drugi medijatori nisu dovoljno zastupljeni ili uopće nisu proučavani u MCI-u i AD-u (98). Jedna meta-analiza ističe da su TGF-β (*Transforming growth factor β*), YKL-40 i MCP-1 značajno povišeni u likvoru pacijenata s AD-om, a koncentracije IL-1β i IL-6 u krvi pokazuju moguću povezanost s AD-om, za razliku od koncentracija istih citokina u likvoru (20). Analize koncentracija citokina višestrukom ELISA metodom pokazale su da su specifični profili upalnih medijatora povezani s različitim stupnjem narušavanja krvno-moždane barijere (99). Upotrebom spomenute metode istraživanje 27 različitih citokina pokazalo je povišene koncentracije većine ispitanih citokina (kako pro- tako i protuupalnih) u likvoru bolesnika s AD-om, što ukazuje na istovremenu prisutnost i degenerativnih i kompenzatornih regenerativnih procesa (100). Određivanje cjelovitog profila biomarkera upale u ovisnosti od jačine i stadija bolesti pomoću višestruke ELISA metode će upotpuniti i povećati prediktivnu vrijednost dosad korištenih bioloških biljega u likvoru. Sve navedene studije ukazuju na poremećenu ravnotežu upalnih medijatora u AD-u, ali djelovanje isključivo u smjeru utišavanja nije pokazalo dobre rezultate te nam govori da bi se jedino preciznim usmjeravanjem odgovora i vraćanjem ravnoteže pro- i protuupalnih medijatora mogao umanjiti utjecaj imunološkog sustava na nastanak i progresiju bolesti. Huang i suradnici sumirali su razloge koji utječu na rezultate mjerenja biljega bolesti CNS-a u perifernoj krvi te ponudili moguća rješenja (101). Kao mane određivanja biljega u krvi ističu razgradnju biljega protezama u krvi, nedovoljno poznat mehanizam transporta tvari iz mozga u perifernu krv, postojanje veće heterogenosti vrijednosti među pojedincima te prisutnost biljega koji su porijeklom iz perifernih tkiva i organa. Osim toga, samo dio biljega iz CNS-a dospije u krv. Za uspostavljanje i standardizaciju biljega iz krvi potrebno je razviti puno osjetljivije metode detekcije, ujednačiti

granične vrijednosti te metode i vrijeme uzimanja uzoraka, a buduća istraživanja trebala bi uključivati i metode procjene stanja BBB-a (101).

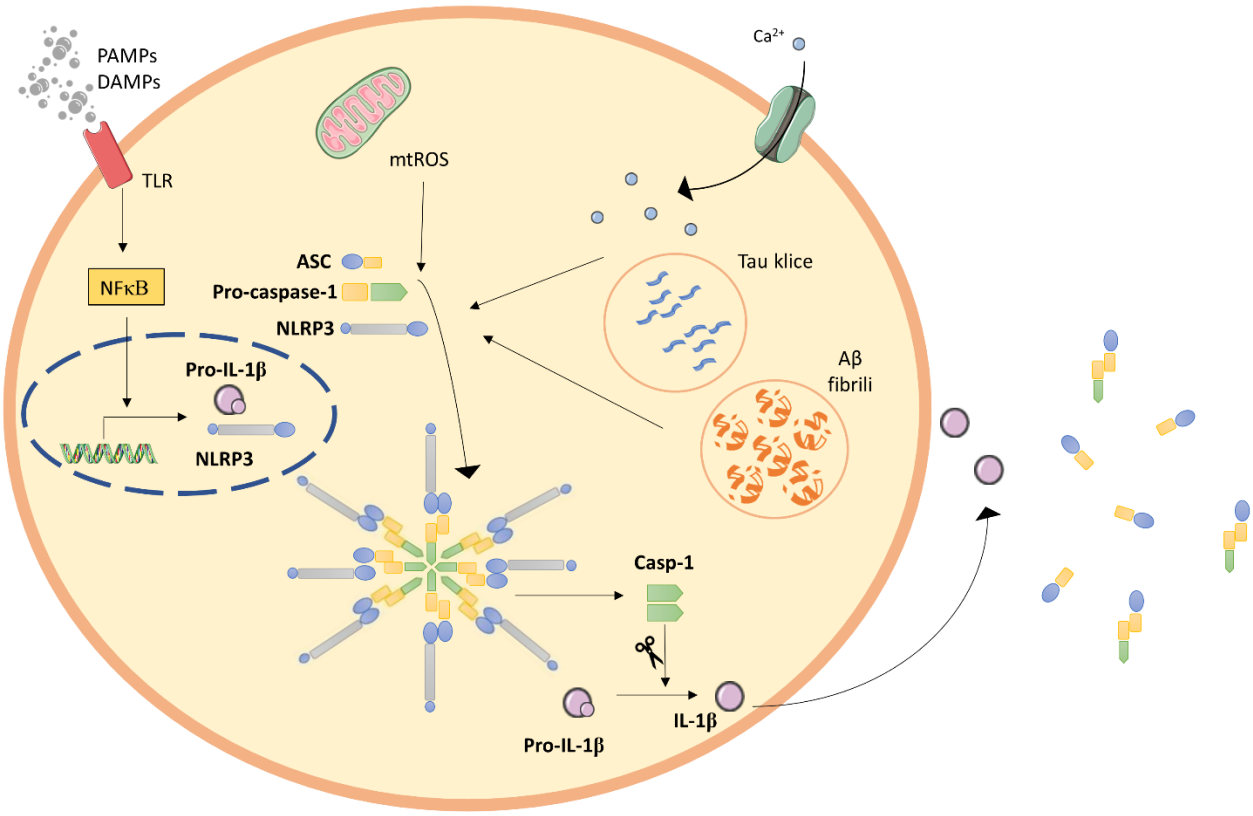
1.4.6. Inflamasomi u patogenezi Alzheimerove bolesti

Jedan od načina štetnog utjecaja kronično aktivne mikroglije je prekomjerna aktivacija inflamasoma. Inflamasomi su proteinski kompleksi koji nastaju uslijed aktivacije citoplazmatskih receptora sličnih NOD-u (*nucleotide-binding oligomerization domain-like, Nod leucine-rich repeat-containing receptors*, NLR) koji pripadaju receptorima urođene imunosti i prepoznaju PAMP-ove i DAMP-ove (31). Postoji više od 20 različitih NLR receptora, a u kontekstu ovog istraživanja fokusirat ćemo se na receptore NLRP (*Nucleotide-binding oligomerization domain, Leucine rich Repeat and Pyrin domain containing*) porodice koji stvaraju komplekse inflamasoma (31). Poznato je mnogo različitih inflamasoma, ali u kontekstu AD-a najbolje je istražena uloga NLRP3 i NLRP1 inflamasoma (102–109). Kompleksi inflamasoma sastoje se od oligomera senzornih molekula (NLRP3, NLRP1), adaptorskog proteina te neaktivnog oblika kaspaze 1 (pro-Casp-1) (31). Aktivacija inflamasoma započinje vezanjem liganada na senzorne molekule što rezultira oligomerizacijom više NLRP molekula i sklapanjem kompleksa s ASC (*apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase-recruitment domain*) adaptorskim proteinom i pro-Casp-1. Rezultat aktivacije inflamasoma je proteolitičko cijepanje pro-Casp-1 i otpuštanje aktivnog oblika Casp-1 koja zatim posreduje nastanak aktivnih oblika citokina porodice IL-1 (IL-1β i IL-18) (31). Aktivna Casp-1 uzrokuje i cijepanje gazdermina D (GSDMD), koji je glavni posrednik stanične smrti uzrokovane upalom – piroptoze (104, 110, 111). Aktivacija NLRP3 i NLRP1 inflamasoma zabilježena je u mozgu osoba s AD-om te se sve više istražuje njihova moguća uloga u nastanku i progresiji bolesti.

1.4.6.1. NLRP3 inflamasom u patogenezi Alzheimerove bolesti

U kontekstu AD-a, NLRP3 inflamasom se aktivira detekcijom patološki promijenjenog Aβ-a i njegovom fagocitozom, a aktivacija inflamasoma dalje doprinosi nastanku i pogoršanju patoloških promjena (**Slika 4**) (102, 105, 112-115). Nasuprot tomu, inhibicija NLRP3 inflamasoma djeluje zaštitno u odnosu na potencijalne štetne učinke Aβ-a (116,117). Inokulacija ASC proteina u

hipokampus transgeničnog mišjeg modela AD-a uzrokovala je širenje patoloških promjena Aβ-a, a homogenati mozgova tih miševa nisu potakli širenje patoloških promjena amiloida u mozgu miševa koji nisu eksprimirali ASC protein (113). Taj nalaz ukazuje na štetan utjecaj aktivacije NLRP3 inflamasoma. Upotreba pterostilbena, derivata flavonoida reservatrola, smanjila je citotoksičnost Aβ-a u kulturi BV2 mikroglije blokiranjem aktivacije NLRP3 inflamasoma (117). Sličan učinak blokiranja aktivacije NLRP3 inflamasoma pokazan je i *in vivo* u APP/PS1 transgeničnom mišjem modelu AD-a, gdje je primjena blokatora NLRP3 inflamasoma značajno smanjila broj amiloidnih plakova i poboljšala kognitivne sposobnosti životinja (116). Patološki promijenjen protein tau također utječe na aktivaciju NLRP3 inflamasoma (107). Agregirani oblici tau proteina potiču aktivaciju NLRP3 u kulturi, a u životinjskim modelima aktivacija NLRP3 doprinosi širenju neurofibrilarne degeneracije, dok ju nedostatak ASC proteina zaustavlja (107,108). Aktivnost NLRP3 inflamasoma potiče hiperfosforilaciju i agregaciju proteina tau (108), kao i agregaciju i nakupljanje Aβ-a (113). Kao što je već navedeno, pored transinaptičkog širenja mikroglija također može posredovati širenje patoloških oblika proteina tau (5,64,66,71,118). Objavljeni rezultati upućuju na zaključak da mikroglija unosi patološki promijenjene tau oblike i sortira ih u lizosome. To može izazvati lizosomsku nestabilnost te aktivaciju NLRP3 inflamasoma (**Slika 4**) (107). Franklin i suradnici pokazali su da se uslijed piroptoze agregati ASC-a nakupljaju izvan stanica gdje dalje uzrokuju porast IL-1β-a, a mogu izazvati i aktivaciju Casp-1 u susjednim stanicama i bez dodatnih signala koji aktiviraju NLRP3 (119). Iz navedenih nalaza je predložena hipoteza o širenju upalnih promjena u tijeku AD-a.



Slika 4. Shematski prikaz aktivacije NLRP3 inflamasoma u AD-u. Prema podacima iz Stancu i sur. 2019. (107); preuzeto i prilagođeno iz Španić i sur. 2019. (118)

1.4.6.2. NLRP1 inflamasom u patogenezi Alzheimerove bolesti

Uz mikrogliju, i neuroni mogu doprinijeti upalnom odgovoru. NLRP1 inflamasom je u CNS-u poglavito izražen u piramidnim neuronima i oligodendrogliji (120), a neki polimorfizmi gena *NLRP1* u pozitivnoj su korelaciji s nastankom AD-a (103). U životinjskom modelu AD-a povećan je izražaj NLRP1 u mozgu, a njegov se izražaj povećava i dodatkom Aβ-a kortikalnim neuronima u kulturi. Suprotno, utišavanje gena za *NLRP1* ima zaštitni učinak za neurone te poboljšava kognitivne sposobnosti u životinjskim modelima AD-a (106). Casp-1 također može aktivirati i Casp-6 (121) što to je pokazano i u kulturi primarnih neurona ljudskog mozga kao posljedica aktivacije NLRP1 inflamasoma (122). Ističe se i veći izražaj NLRP1 molekule u mozgu oboljelih od AD-a u usporedbi s kontrolama (122). Pretpostavlja se da stanični stres uzrokovan različitim čimbenicima uključenima u nastanak sporadičnog oblika AD-a ili mutacijama gena koje dovode

do nasljednog oblika AD-a mogu poticati aktivaciju NLRP1 inflamasoma, koji zatim pospješuje procese povezane s upalom u astrocitima i mikrogliji (122). Sarasella i suradnici pokazali su da monociti oboljelih od AD-a imaju povećanu ekspresiju gena povezanih s aktivacijom i NLRP1 i NLRP3 inflamasoma te da se oba inflamasoma aktiviraju dodavanjem Aβ-a kulturi stanica istih monocita (123). Iz navedenog se može zaključiti da oba inflamasoma mogu utjecati na nastanak i progresiju AD-a, ali točna narav njihove nekontrolirane aktivacije i vremenski slijed patoloških promjena u AD-u i dalje nisu poznati.

1.4.6.3. Mjerenje količine izvanstaničnog proteina ASC

Nakupine ASC proteina otpuštaju se iz stanica nakon piroptoze i potiču daljnje širenje upale (119), a izvanstanične koncentracije ASC-a mogu se mjeriti u biološkim tekućinama i pokazatelj su aktivacije inflamasoma (19,124,125). Jedno nedavno istraživanje pokazalo je povišene koncentracije ASC proteina u serumu ispitanika s MCI-jem u odnosu na kontrolnu i skupinu osoba s AD-om, pa se može reći da ASC spada u skupinu obećavajućih biomarkera za razlikovanje promjena imunološkog odgovora u MCI-ju i AD-u (19). Koncentracije ASC proteina i IL-18 također su potencijalni biološki biljezi traumatske ozljede mozga (*traumatic brain injury*, TBI) (125), a sam ASC protein mogući je biomarker i za multiplu sklerozu (MS) (124). U našem istraživanju htjeli smo analizirati odnose koncentracija ASC proteina u likvoru i plazmi MCI i AD bolesnika te ih usporediti s koncentracijama drugih pokazatelja patoloških promjena i upale u AD-u.

1.4.7. Stečena imunost u Alzheimerovoj bolesti

Većina istraživanja povezanih s ulogom imunosnog sustava u patogenezi AD-a u prvi plan stavlja aktivaciju urođene imunosti, no u novije vrijeme se sve intenzivnije istražuje i uloga stanica stečenog imunološkog sustava zbog otkrića limfnih žila koje se nalaze uzduž gornjeg sagitalnog i transverznog duralnog sinusa, a dreniraju se u duboke limfne čvorove vrata (126). Navedene se limfne žile mogu slikovno prikazati strukturnim MRI-jem (127), a u njima je dokazana prisutnost stanica stečene imunosti B i T limfociti, kao i stanica koje prezentiraju antigene, napose dendritičkih stanica (126). Stoga ne čudi da se u perifernoj krvi mogu naći protutijela na

fosforilirane tau proteine koji se nalaze samo u mozgu (128). Iako se zna da je CNS višestrukim barijerama odvojen od perifernih tkiva, infiltracija imunosnih stanica s periferije može biti pojačana tijekom procesa starenja ili razvoja bolesti CNS-a jer je u tim stanjima lučenje citokina koji ih privlače mnogo veće (33). Osim toga, narušen je i integritet BBB što povećava njezinu permeabilnost i dodatno olakšava ulazak imunokompetentnih stanica u CNS (50). U transgeničnom mišjem modelu AD-a (3xTg-AD) s ubačena tri mutirana gena (APP_{swe}, $PS1_{M146V}$ i tau_{P301L}) prisutna je pojačana aktivnost B i T stanica (129), a u sličnom modelu (Rag-5xfAD) kojem su uklonjene T, B i NK stanice zabilježene su veće koncentracije Aβ-a u mozgu te amiloidni plakovi većeg volumena, pojačana upala i smanjena sposobnost fagocitoze mikroglije (130), što sve ukazuje na zaštitnu ulogu stanica stečene imunosti u AD-u. Nasuprot tome, u perifernoj krvi i likvoru oboljelih od AD-a pronađen je povećan broj CD8+ T limfocita te je njihov porast povezan sa smanjenjem kognitivnih sposobnosti (131), što ukazuje da pojačana aktivnost stečene imunosti može utjecati na progresiju AD-a. Jedna nedavna studija pokazala je zanimljivu međuovisnost stečene i urođene imunosti tijekom razvoja (132). Naime, u mozgu miševa i ljudi pronađena je posebna populacija CD4+ T stanica koje uvjetuju sazrijevanje mikroglije, pa bez njih mikroglija ne može u potpunosti izraziti zreli fenotip koji je povezan sa sazrijevanjem sinapsi (132). Iako je mozak samo djelomično imunoprivilegiran organ, sve više se otkriva bitna uloga interakcije stanica urođene i stečene imunosti, kako u razvoju tako i tijekom nastanka neurodegenerativnih bolesti. Uloga stečene imunosti u AD-u nije razjašnjena, pa je logično zaključiti da bi bolje razumijevanje interakcije stečene i urođene imunosti tijekom različitih stadija bolesti moglo pomoći u otkrivanju novih potencijalnih lijekova za regulaciju imunološkog odgovora u AD-u.

2. HIPOTEZA

Usporedba skupina ispitanika s Alzheimerovom bolesti (AD), blagim spoznajnim poremećajem (MCI) i kognitivno zdravih kontrola pokazat će povećane koncentracije proupalnih medijatora u likvoru i plazmi te jače izraženu aktivaciju mikroglija stanica, NLRP3 i NLRP1 inflamasoma u postmortalnom tkivu hipokampalne formacije u AD-u u odnosu na kontrolnu skupinu.

3. CILJEVI

3.1. Opći cilj:

Istražiti upalne procese u Alzheimerovoj bolesti analizom plazme, likvora i moždanog tkiva zdravih i oboljelih osoba.

3.2. Specifični ciljevi:

1. Odrediti profil pro- i protuupalnih medijatora u likvoru i plazmi te biloških biljega AD-a (Aβ, ukupnog i fosforiliranog proteina tau) u likvoru ispitanika s AD-om, blagim spoznajnim poremećajem i kognitivno zdravih kontrola (*healthy control*, HC) te utvrditi njihovu korelaciju.

2. Odrediti koncentracije TREM2 i ASC proteina u likvoru i plazmi ispitanika s AD-om, MCI-jem i HC, korelirati ih s vrijednostima bioloških biljega u likvoru te utvrditi njihov biomarkerski potencijal u dijagnostici Alzheimerove bolesti.

3. Ispitati aktivnost mikroglija stanica te NLRP3 i NLRP1 inflamasoma u postmortalnim uzorcima hipokampalne formacije ispitanika s AD-om i kontrola.

4. MATERIJALI I METODE

4.1. Uzorak za imunohistokemijsu analizu

Kao materijal za imunohistokemijske metode koristili su se uzorci moždanog tkiva dobiveni *post mortem* od 11 osoba s AD-om i 9 kontrolnih uzoraka iz zbirke iz zbirke Huddinge Brain Bank, Karolinska Institute, Stockholm, Švedska. Inicijalno je planirano najmanje deset uzoraka moždanog tkiva po skupini, što je i prikupljeno ali naknadnim uvidom u podatke jednog od kontrolnih uzoraka zaključeno je da uzorak ne odgovara kriterijima kontrolne skupine te je izuzet iz daljnje analize. Moždano tkivo prikupljeno je i korišteno u skladu s propisanim etičkim pravilima i uz odobrenje etičkog povjerenstva. Uzorci AD dobiveni su od osoba kojima je za života klinički dijagnosticirana Alzheimerova bolest, a neuropatološkom analizom *post mortem,* potvrđena dijagnoza pomoću CERAD (*Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease*) kriterija (133). Kao kontrolni uzorci korišteni su rezovi mozga osoba koje za života nisu bolovale od neuroloških ili psihijatrijskih poremećaja niti je uzrok smrti bio povezan s nekim od navedenih poremećaja ili traumom glave (**Tablice 1** i **2**). Navedeni uzorci tkiva dio su arhivskog materijala čija analiza je u više navrata prethodno već odobrena od Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta u Zagrebu (ur. br. 04-1378-2006, od 17. veljače 2007. godine; ur. br. 04-76/2005-46 od 28. veljače 2005. godine; ur. br. 04-1213/03/2S/R09, od 12. rujna 2003. godine).

Tablica 1. Podaci o kontrolnim uzorcima

Uzorak	HC		
	Dob	Spol	Uzrok smrti
HC1	59	M	Prometna nesreća
HC2	62	F	Prometna nesreća
HC3	68	M	Prometna nesreća
HC4	71	F	Infarkt miokarda
HC5	75	M	Prometna nesreća
HC6	77	F	Infarkt miokarda
HC7	81	F	Infarkt miokarda
HC8	84	F	Plućna embolija
HC9	85	F	Kardiovaskularno zatajenje

Tablica 2. Podaci o uzorcima AD skupine

Uzorak	AD				
	Dob	Spol	Trajanje bolesti (godine)	Uzrok smrti	NINCDS-ADRDA dijagnoza
AD1	73	F	4	Bronhopneumonija	AD
AD2	73	M	7	Bronhopneumonija	AD
AD3	77	M	3.5	Bronhopneumonija	AD
AD4	80	F	5	Bronhopneumonija	AD
AD5	80	F	6	Infarkt miokarda	AD
AD6	81	M	3	Bronhopneumonija	AD
AD7	83	F	5.5	Kardiovaskularno zatajenje	vjerojatni AD
AD8	84	F	3.5	Kardiovaskularno zatajenje	AD
AD9	84	F	3.5	Kardiovaskularno zatajenje	AD
AD10	88	F	4.5	Karcinom	vjerojatni AD
AD11	91	F	4	Bronhopneumonija	vjerojatni AD

Nakon obdukcije medijalni dijelovi sljepoočnog režnja izrezani su u blokove u frontalnoj ravnini na debljinu od 3 mm paralelno jedan u odnosu na drugi, a u rostrokaudalnom smjeru okomito na septotemporalnu osovinu te su fiksirani i uklopljeni u parafinske blokove. Za daljnju analizu od hipokampalnog tkiva napravljeni su rezovi debljine 12 μm. U istraživanju su korišteni slučajni rezovi različitih razina hipokampusa i uspoređivani su na istoj ili približno istoj razini reza patološkog i kontrolnog tkiva.

4.2. Uzorak za analizu likvora i plazmi

Za analizu likvora i plazmi koristili su se uzorci prikupljeni u Zavodu za kognitivnu neurologiju KBC-a Zagreb. Prikupljanje uzoraka cerebrospinalne tekućine i krvi vršilo se uz informirani pristanak ispitanika ili skrbnika. Obrada i izuzimanje navedenih uzoraka bila je u skladu s međunarodnim standardima Dobre kliničke prakse (*International Conference on Harmonization*, 2013), standardima Helsinške deklaracije (*World Medical Association*, 2013) te je odobrena od strane Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (ur. br. 380-59-10106-18-111/126, klasa 641-01/18-02/01; ur. br. 380-59-10106-19-111/251, klasa 641-01/19-02/01) 20. lipnja 2018. godine i 24. listopada 2019. te Etičkog povjerenstva Kliničkog bolničkog centra

Zagreb (klasa 8.1-19/201-2, broj 02/21 AG) 23. rujna 2019. godine. Uzorci su se prikupljali u jednoj vremenskoj točki (presječno istraživanje, *cross-sectional study*) prilikom rutinske obrade, a prikupljanje likvora vršilo se od ožujka 2021. do ožujka 2022. godine, dok su zbog objektivnih razloga za analizu korišteni i uzorci likvora i plazme prikupljeni ranije za potrebe projekta HRZZ-a. Zaštita podataka u skladu je s Općom uredbom o zaštiti podataka SL EU S119 (Uredba EU 2016/679 Europskog parlamenta i Vijeća od 27. travnja 2016. o zaštiti pojedinaca u vezi s obradom osobnih podataka i o slobodnom kretanju takvih podataka). Prikupljeni podatci u potpunosti su anonimizirani na način da ispitanike nije moguće izravno niti neizravno identificirati, a pristup kodovima (šiframa) pod kojima se vode imaju samo voditelj istraživanja i doktorand, ti kodovi ne sadržavaju imena, adrese niti bilo koji drugi podatak po kojemu bi se rezultati mogli povezati s ispitanikom. Svaki je ispitanik prošao temeljit neurološki pregled, neuropsihološko testiranje te rutinske krvne pretrage. Težina demencije se određivala upotrebom MMSE (*Mini-Mental State Examination*) ljestvice (0-30 bodova), a klinička dijagnoza AD-a se temelji na NIA-AA (*National Institute on Aging-Alzheimer's Association guidelines for the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease*) (134, 135), NINCDS-ADRDA (*National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke and Alzheimer's Disease and Related Disorders Association) i DSM-IV-TR (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*) kriterijima. Dijagnoza MCI određena je prema Petersen i sur. (136) te Albert i sur. (137). Likvor se prikupljao lumbalnom punkcijom iz L3/L4 ili L4/L5 intervertebralnog prostora. Dio volumena uzorka koji nije bio potreban za rutinsku obradu je centrifugiran na 10,000 g 10 min pri 4°C, alikvotiran i pohranjen na -80°C u polipropilenskim epruvetama za željene analize. Iz pune krvi pacijenata nizom centrifugiranja se izdvojila plazma bez trombocita te je bila pohranjena na -20°C za daljnju analizu.

Na temelju broja bodova na, za hrvatsku populaciju ispitanika validiranoj MMSE ljestvici, svi ispitanici su podijeljeni u tri skupine: skupinu osoba s Alzheimerovom bolešću (AD, MMSE $\leq$ 23 boda), skupinu osoba s MCI-om (MMSE 24-26) te kontrolnu skupinu kognitivno zdravih ispitanika (HC; MMSE >27). Na temelju našeg prethodnog istraživanja (138) pomoću testa snage odredili smo potreban broj ispitanika za ovo istraživanje (https://rpsychologist.com/d3/nhst/). Uz stupanj značajnosti α=0,05, snagu učinka (1-β) od 0,8 te procijenjene veličine učinka (d) između skupine osoba s AD-om i kontrola od 0,67. Budući da su promjene tau proteina višestruko potvrđena i najkarakterističnija promjena u AD-u u odnosu na HC, veličinu učinka izračunali smo

iz srednjih vrijednosti koncentracije ukupnih tau proteina u likvoru za AD i kontrolnu skupinu: $\bar{x}$ (AD) - $\bar{x}$ (HC) / SD (AD), tj. 520 pg/ml - 255,4 pg/ml / 394,4 pg/ml = 0,67. Test snage pokazao je da je za testiranje nul-hipoteze pomoću dvostranog (two-tailed) t-testa u svakoj od dviju skupina (AD i HC) potrebno 17,48 ispitanika. Zbog mogućih stršala (outliers), odlučili smo da će u svakoj od navedenih skupina biti najmanje 20 ispitanika.

4.3. Metoda imunohistokemije

4.3.1. Primarna protutijela korištena za metode imunohistokemije i imunofluorescencije

- IBA1 (FUJIFILM Wako Shibayagi, AB_839504)
- CD68 (Agilent, AB_2314148) (Diferencijacijski antigen mikroglija stanica; *clusters of differentiation*)
- HLA-DR (Agilent, AB_2313661)
- NLRP3 (Thermo Fisher Scientific, AB_2809541)
- NLRP1 (Abcam, AB_776633)
- ASC (Invitrogen, AB_2804676)
- cGSDMD (Cell Signaling, AB_2799099)
- CASP-6 (Antibodies-online, AB_2290879)
- AT8 (Thermo Fisher, AB_223647)

4.3.2. Imunohistokemijska vizualizacija

Za vizualizaciju aktivacije mikroglije te NLRP3 i NLRP1 inflamasoma uzorci moždanog tkiva osoba s Alzheimerovom bolešću i kontrolni uzorci podvrgnuti su imunohistokemijskom bojanju navedenim primarnim protutijelima. Aktivacija mikroglije vizualizirana je biljezima IBA1 (*Ionized calcium Binding Adaptor molecule 1*), CD68 (*cluster of differentiation 68*) te HLA-DR (*Human Leukocyte Antigen*).

Preparati su najprije deparafinizirani 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 (*phosphate buffered saline*, pH=7,4), a otvaranje epitopa

antigena (*antigen retrieval*) izvršeno je kuhanjem u citratnom puferu (pH=6,0), najprije 5 puta oko 1 minute na 700W te zatim 20 min na 300W.

Endogene peroksidaze inaktivirane su predtretmanom metanolom i 0,02%-tnim vodikovim peroksidom. Nakon daljnjeg ispiranja PBS-om uslijedilo je blokiranje nespecifičnog vezanja 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 (*normal goat serum*) u 0,5%-tnom Triton/PBS. Otopina za blokiranje preparata koji su tretirani primarnim protutijelima za biljege CD68 i HLA-DR te NLRP1, ASC, CASP-6, cGSDMD, sadrži 5%-tnu otopinu BSA (*bovine serum albumin*) u 0,5%-tnom Triton/PBS. Blokiranje je provedeno kroz 60 min na sobnoj temperaturi u vlažnoj komori.

Primarna protutijela razrijeđena su u odgovarajućoj otopini za blokiranje u omjerima:

- Iba1 – 1:250
- CD68 – 1:1250
- HLA-DR – 1:300
- NLRP3 – pokušaj više različitih razrijeđenja i otopina boliknga → nismo uspjeli vizualizirati navedeni biljeg
- NLRP1 – 1:100
- ASC – 1:100
- cGSDMD – 1:500
- CASP-6 – 1:100

Preparati su inkubirani u otopini primarnog protutijela preko noći na 4°C. Za kontrolu bojanja za svaki od navedenih biljega uzet je dodatni uzorak koji nije tretiran primarnim protutijelom, takozvana negativna kontrola (NK), odnosno kontrola specifičnosti vezanja primarnog protutijela. Nakon inkubacije primarnim protutijelom i ispiranja u PBS-u, preparati su inkubirani u odgovarajućim otopinama sekundarnih protutijela.

Sekundarno protutijela anti-mouse ili anti-rabbit (Vector Laboratories, Newark, CA, USA, AB_2336810, AB_2336811) razrijeđena su u omjeru 1:200 u dvostruko razrijeđenim otopinama

za blokiranje. Inkubacija preparata provedena je u vlažnoj komori kroz 60 min nakon čega je uslijedilo ispiranje PBS-om a u otopini sekundarnog protutijela inkubirani su i NK rezovi .

Tercijarno protutijelo također se priprema u dvostruko razrijeđenim otopinama za blokiranje, kao i sekundarno. Tercijarno protutijelo (Vector Laboratories, AB_2336810, AB_2336811) pripremljeno je u omjeru 10:2000. 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 D0426), a pripremljena je prema uputama proizvođača. Preparati su nakapani otopinom za vizualizaciju i inkubirani na sobnoj temperaturi do optimalnog obojenja. 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.

4.3.3. Dvostruko bojanje metodom imunofluorescencije

Za metodu dvostrukog bojanja imunofluorescencijom korištena su ista primarna protutijela kao i za imunohistokemiju te sljedeća sekundarna protutijela:

- AlexaFluor AF488 goat, anti-mouse IgG, Thermo Fisher Scientific, AB_2534088
- AlexaFluor AF488 goat, anti-rabbit IgG, Thermo Fisher Scientific, AB_2576217
- AlexaFluor AF546 goat, anti-mouse IgG, Thermo Fisher Scientific, AB_2534089
- AlexaFluor AF546 goat, anti-rabbit IgG, Thermo Fisher Scientific, AB_2534093

Deparafinizacija, rehidracija i otkrivanje antigena te inkubacije primarnih protutijela napravljeni su isto kao i za metodu imunohistokemije kako je prethodno opisano. Za sva navedena primarna protutijela korištena je ista otopina za blokiranje: 1% BSA u 0,5% Triton/PBS. Nakon inkubacije primarnim protutijelima preparati su isprani u PBS-u i inkubirani u odgovarajućim otopinama fluorescentno obilježenih sekundarnih protutijela 2 sata na sobnoj temperaturi.

Nakon inkubacije u otopini sekundarnih protutijela i ispiranja u PBS-u, preparati su inkubirani 45 sekundi otopinom blokatora autofluorescentnog signala (TrueBlack Autofluorescence quencher) pripremljenom prema receptu: 5 µL TrueBlack + 100 µL 70% etanola. Nakon ispiranja u PBS-u preparati su prekriveni medijem za pokrivanje koje sadrži DAPI (Vectashield Antifade Mounting Medium with DAPI).

4.3.4. Snimanje mikrofotografija

Imunohistokemijski preparati analizirani su i poslikani mikroskopom Olympus BX53 (Olympus, Tokyo, Japan). Preparati na kojima su vizualizirani biljezi mikroglije skenirani su kamerom Hamammatsu Nanozoomer 2.0. RS (Hamammatsu, Japan). Preparati imunofluorescencije vizualizirani su i poslikani konfokalnim mikroskopom Olympus FV3000 (Tokyo, Japan).

4.4. 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.

4.5. Analiza imunohistokemijskih preparata

Prilikom semikvantitativne i kvantitativne analize preparata, šifre uzoraka i eksperimentalne grupe nisu bile vidljive.

4.5.1. Analiza izražaja biljega mikroglije

Izražaj biljega mikroglije analiziran je semikvantitativno prema sljedećim bodovnim skalama:

Imunoreaktivnost IBA1 i HLA-DR 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 ativiranih

3 = mnogo difuzno raspoređenih imunoreaktivnih stanica, sve su aktivirane

4 = mnogo velikih nakupina aktiviranih mikroglija stanica

Imunoreaktivnost CD68 biljega kvantificirana je prema skali:

0 = imunoreaktivnost nije prisutna

1 = prisutno je nekoliko imunoreaktivnih stanica

2 = umjeren broj imunoreaktivnih stanica

3 = mnogo difuzno raspoređenih imunoreaktivnih stanica

4 = mnogo velikih nakupina imunoreaktivnih mikroglija stanica

Područja hipokampalne formacije (nazubljena vijuga (GD), hilus, CA2/3, CA1, subikulum (SUB) i bijela tvar) određena su prema radu Westa i Gundersena (139).

Zbog nemogućnosti preciznog i ujednačenog određivanja granica entorinalne moždane kore na svakom od preparata analiza tog dijela preparata nije napravljena.

4.5.2. Analiza izražaja biljega aktivacije inflamasoma

Vizualizacija NLRP3 biljega nije bila uspješna niti nakon više pokušaja optimizacije uvjeta metode pa navedeni preparati nisu niti analizirani.

Kvantifikacija izražaja ostalih biljega aktivacije inflamasoma NLRP1, CASP-6, cGSDMD i ASC izvršena je brojanjem svakog pozitivnog signala u neuronima hCA3, CA2/3, CA1 i SUB regija.

Konačni rezultati prikazani su kao gustoća imunopozitivnih signala, odnosno brojevi pozitivnih signala podijeljeni su s površinom analizirane regije. Površina je mjerena u programu CellSens-V0301 Imaging software (Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, Njemačka).

4.6. Enzimski povezana imunoapsorpcijska analiza – ELISA

Analize koncentracija sTREM2 napravljene su na 98 AD, 35 MCI i 11 HC uzoraka plazme i 155 AD, 90 MCI i 50 HC uzorka likvora.

Analize koncentracija ASC proteina napravljene su na 82 AD, 33 MCI i 9 HC uzoraka plazmi te 127 AD, 78 MCI i 39 HC uzoraka likvora.

Koncentracije bioloških biljega u likvoru i plazmi su određene pomoću enzimski povezane imunoapsorpcijske analize (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*, ELISA) prema zadanim protokolima tržišno dostupnih kitova:

- Aβ1-42 (Innotest β-amyloid1-42, Fujirebio, Gent, Belgija)
- ukupni tau (Innotest hTau Ag, Fujirebio, Gent, Belgija)
- p-tau181 (Innotest Phospho-Tau(181P), Fujirebio, Gent, Belgija)
- ASC (Human PYCARD/ASC/TMS1 Sandwich ELISA, LSBio, Seattle, Washington, United States)
- TREM2 (Human TREM2 ELISA Kit, Abcam, Cambridge, United Kingdom)

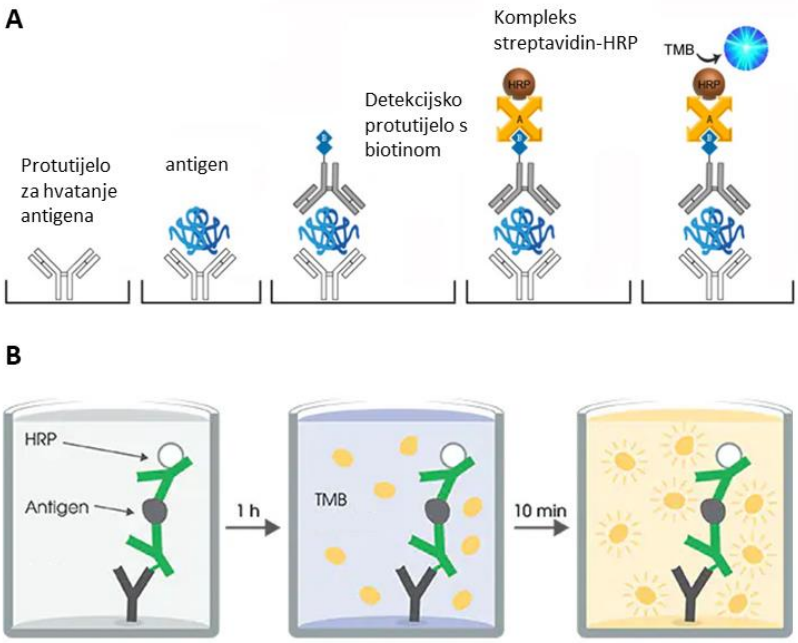
ELISA kitovi Aβ1-42, t-tau, p-tau181 i ASC uključuju mikrotitarske pločice s 96 jažica presvučene monoklonskim protutijelima na željeni protein (**Slika 5**). Na pločice se nanose standardi, prazne probe i uzorci u određenom razrijeđenju koje se prilagodi svakom od kitova. Standardi su se razrjeđivali prema uputama proizvođača iz otopine dobivene otapanjem liofiliziranog rekombinantnog proteina. Nakon dodavanja uzoraka i standarda slijedila je inkubacija na pločici, a razrjeđenja uzoraka, uvjeti i duljina inkubacije ovisili su o protokolu (**Tablica 3**). Nakon ispiranja u puferu za ispiranje na aparatu za ispiranje (PW 40, Biorad Laboratories, Hercules, CA, SAD), u pločice se dodavalo detekcijsko protutijelo. Po inkubaciji protutijela, pločice su se ponovno isprale. Dodan je kompleks streptavidina koji je obilježen enzimom HRP (peroksidaza iz hrena, *horseradish peroxidase*) (streptavidin se s visokim afinitetom veže na biotin na detekcijskom

protutijelu) te se inkubirao prema podacima u Tablici 3, nakon čega se pločica isprala i dodao se kromogen (TMB, 3,3',5,5-tetrametilbenzidin) kao supstrat za enzim HRP. Nakon inkubacije kromogenom u mraku, dodala se otopina koja je zaustavila reakciju te se uz pomoć čitača mikroploča Glomax Explorer (Promega, Madison, WI, SAD) pri 450 nm očitavala apsorbancija. Koncentracije proteina su se određivale prema krivulji dobivenoj iz koncentracija standarda uz pomoć 4-parametarskog algoritma u GraphPad Prism 8.0 programu (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, SAD).

Tablica 3. ELISA protokoli za detekciju $A\beta_{1-42}$, t-tau, p-tau_{181} i ASC proteina

Analizirani protein	Volumen nanesenog uzorka	Inkubacija s detekcijskim protutijelom	Volumen streptavidin-HRP konjugata i vrijeme inkubacije	Volumen kromogena i vrijeme inkubacije	Volumen otopine za zaustavljanje reakcije
$A\beta_{1-42}$	25 µL	1 h, 25 °C	100 µL, 30 min	100 µL, 30 min	50 µL
t-tau	25 µL	1 h, 25°C	100 µL, 30 min	100 µL, 30 min	50 µL
p-tau_{181}	75 µL	1 h, 4 °C	100 µL, 1 h	100 µL, 30 min	50 µL
ASC	50 µL	1 h, 37°C	100 µL, 1 h	90 µL, 16 min	50 µL

ELISA kit za detekciju TREM2 razlikovao se od prethodno opisanih kitova jer je dno pločice bilo presvučeno protutijelom koje je specifično za antitijelo za hvatanje željenog analita (*capture antibody*) (**Slika 5**). U jažice se istovremeno nanosi 50 µL standarda, prazne probe, uzorka razrijeđenog u omjeru 1:50 s otopinom za razrjeđenje uzoraka (*sample diluent*) te 50 µL otopine detekcijskog i protutijela za hvatanje analita. Otopina protutijela pripremljena je dodavanjem oba protutijela početne koncentracije 10x u otopinu za razrjeđenje protutijela (antibody diluent) do koncentracije 1x. detekcijsko protutijelo obilježeno je HRP enzimom. Uzorci su inkubirani 1 h na tresilici pri 400 rpm na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije pločica je isprana i dodan je TMB kromogen koji je inkubiran 10 min u mraku na tresilici pri 400 rpm. Po završetku inkubacije dodano je 100 µL otopine za zaustavljanje reakcije, pločica je stavljena na tresilicu na 400 rpm 30 s i očitana je apsorbancija na 450 nm čitačem mikroploča Glomax Explorer (Promega, Madison, WI, SAD). Koncentracije su određene kako je opisano i za ostale ELISA kitove.



Slika 5. Princip ELISA metode za detekciju **A**) $A\beta_{1-42}$, t-tau, p-tau_{181} i ASC proteina (preuzeto i prilagođeno iz: https://www.lsbio.com/elisakits/human-pycard-asc-tms1-sandwich-elisa-elisa-kit-ls-f19843/19843#specifications-section), **B**) sTREM2 (preuzeto i prilagođeno iz: https://www.abcam.com/human-trem2-elisa-kit-ab224881.html)

4.7. Višestruka ELISA metoda

Analiza koncentracija citokina i kemokina u napravljena je na 29 AD, 35 MCI i 40 HC uzorka likvora te na 102 AD, 37 MCI i 10 HC uzoraka plazmi.

Višestrukom ELISA metodom mjerene su koncentracije sljedećih imunosnih medijatora:

- bazični FGF - bazični čimbenik rasta fibroblasta (*Fibroblast growth factor-basic)*
- eotaksin
- G-CSF - stimulirajući čimbenik granulocita (*Granulocyte stimulating factor)*
- GM-CSF - stimulirajući čimbenik granulocitno-makrofaznih kolonija (*Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor)*
- IFN-γ – interferon gama

- IL-1β – interleukin 1 β
- IL-1ra – antagonist receptora za interleukin 1 (*Interleukin 1 receptor antagonist)*
- IL-1α – interleukin 1 α
- IL-2Rα - alfa lanac receptora za interleukin 2 (*Interleukin -2 receptor alpha chain*)
- IL-3 – interleukin 3
- IL-12 (p40) – interleukin 12
- IL-16 – interleukin 16
- IL-2 – interleukin 2
- IL-4 – interleukin 4
- IL-5 – interleukin 5
- IL-6 – interleukin 6
- IL-7 – interleukin 7
- IL-8 – interleukin 8
- IL-9 – interleukin 9
- GRO-α - *Growth-regulated alpha protein*
- HGF - čimbenik rasta hepatocita (*Hepatocyte growth factor*)
- IFN-α2 – interferon alfa 2
- LIF – čimbenik inhibicije leukemije (*Leukemia inhibitory factor*)
- MCP-3 – Protein 3 kemoatraktant monocita (*Monocyte chemoattractant protein 3*)
- IL-10 – interleukin 10
- IL-12 (p70) – interleukin 12
- IL-13 – interleukin 13
- IL-15 – interleukin 15
- IL-17A – interleukin 17 A
- IP-10 - protein 10 induciran interferonom gama (*Interferon gamma-induced protein 10*)
- MCP-1 - protein 1 kemoatraktant monocita (*Monocyte chemoattractant protein 1*)
- MIG - monokin induciran interferonom gama (*Monokine induced by gamma interferon*)
- β-NGF – čimbenik rasta neurona beta (*Nerve growth factor beta*)
- SCF - čimbenik matičnih stanica (*Stem cell factor*)
- SCGF-β - čimbenik rasta matičnih stanica beta (*Stem cell growth factor beta*)

- SDF-1α - čimbenik 1 alfa stromalnih stanica (*Stromal cell-derived factor 1 alpha*)
- MIP-1α - upalni protein makrofaga 1 alfa (*Macrophage inflammatory protein 1 alpha*)
- MIP-1β - upalni protein makrofaga 1 beta (*Macrophage inflammatory protein 1 beta*)
- PDGF-BB - trombocitni čimbenik rasta BB (*Platelet derived growth factor BB*)
- RANTES - *Regulated on Activation, Normal T cell Expressed and Secreted*
- TNF-α - faktor tumorske nekroze alfa (*Tumor Necrosis Factor-α*)
- VEGF - čimbenik rasta endotela krvnih žila (*Vascular endothelial growth factor*)
- CTACK - kožni citokin koji privlači T stanice (*Cutaneous T-cell-attracting chemokine*)
- MIF - čimbenik inhibicije migracije makrofaga (*Macrophage migration inhibitory factor*)
- TRAIL - *Tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand*
- IL-18 – interleukin 18
- M-CSF - čimbenik stimulacije kolonija makrofaga (*Macrophage colony-stimulating factor*)
- TNF-β – faktor tumorske nekroze β (*Tumor Necrosis Factor β*)

Koncentracije citokina i kemokina u likvoru i plazmi određene su pomoću višestruke ELISA metode kojom se istovremeno može detektirati veći broj analita. Korišteni su komercijalno dostupni kitovi za analizu 48 ljudskih imunsnih medijatora (Bio-Plex Pro Human Cytokine Screening Panel, 48-Plex #12007283, BioRad, Hercules, CA, SAD) prema uputama proizvođača.

Prije početka protokola potrebno je u programu Bio-Plex Manager 6.2. pripremiti protokol za očitavanje uzoraka i računanje koncentracija. U program se unose vrijednosti standarda, kontrola te koeficijent razrjeđenja uzorka prema kojima program nakon očitanja računa dobivene koncentracije analita u uzorcima. Potrebno je unijeti i redoslijed nanošenja standarda, kontrole, negativne kontrole i uzoraka.

Uzorci likvora i plazme razrijeđeni su odgovarajućim reagensima (likvor: *standard diluent*; plazma: *sample diluent*) u omjeru 1:4. Liofilizirani standardi i kontrole otope se prema uputama proizvođača dodatkom otopine za razrjeđenje standarda (*standard diluent*), otapanje se vrši 30 minuta na ledu. Nakon otapanja standarda, iz koncentrirane otopine prirede se serijska razrjeđenja standarda tako da se u konačnici dobije 8 standarda različitih koncentracija. Nakon pripreme

standarda priprema se otopina magnetnih kuglica. Kuglice se razrijede odgovarajućim diluentom (*assay diluent*) do radne koncentracije.

Protokol započinje dodavanjem kuglica na pločicu s 96 jažica. Magnetne kuglice ispiru se 2x puferom za ispiranje na magnetnoj jedinici za ispiranje (Bio-Plex Pro Wash station). Na kuglice, u svaku jažicu dodaje se 50 µL pripremljenih standarda, kontrola i uzoraka te slijedi inkubacija 30 min na tresilici pri 850 rpm i sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije uzoraka, pločica se ponovno ispire na magnetnoj jedinici za ispiranje 3x nakon čega slijedi aplikacija 25 µL detekcijskog protutijela koje se inkubira 30 min na tresilici pri 850 rpm i sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije pločica se ponovno ispire 3x te se dodaje 50 µL fluorescentno obilježenog streptavidina (streptavidin-PE) koji se inkubira 10 min na tresilici pri 850 rpm i sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije pločica se ispire 3x i magnetne kuglice se resuspendiraju u 125 µL otopine za razrjeđenje (*assay diluent*). Kuglice se resuspendiraju 30 s na tresilici pri 850 rpm i spremne su za očitanje.

Za određivanje koncentracija upalnih medijatora koristio se Bio-Plex® 200 (Bio-Rad, Hercules, CA, SAD) uređaj prema protokolima i uputama proizvođača. Metoda se temelji na načelu imuno-detekcije analita specifičnim protutijelima vezanima na magnetne kuglice. Svaka kuglica koja nosi isto specifično protutijelo odašilje jedinstven spektar fluorescentne svjetlosti nakon aktivacije laserom. Fluorescentni signal detektiran je Bio-Plex® 200 uređajem, a u Bio-Plex Manager 6.2 programu izračunate su vrijednosti koncentracija svakog analita prema standardnoj krivulji.

Kako su koncentracije nekih citokina u likvoru dosta niže u odnosu na koncentracije citokina u plazmi, u analize smo uključili i koncentracije čije su vrijednosti bile niže od vrijednosti standarda te su aproksimacija napravljena prema standardnoj krivulji.

4.8. Statistička analiza

Normalnost distribucije pojedinih skupina podataka određena je Kolmogorov-Smirnov testom. Za analizu razlika između dviju skupina podataka koje nisu pratile normalnu distribuciju (analiza izražaja imunohistokemijskih markera u tkivu) korišten je Mann-Whitneyev test. Razlike između više skupina podataka analizirane su jednosmjernom analizom varijance (ANOVA) ili, u slučaju odstupanja od normalnosti, Kruskal-Wallis testom uz Tukey ili Dunnov *post hoc* test za višestruke

usporedbe. Korelacije između pojedinih skupina provedene su Pearsonovom ili Spearmanovom korelacijom, u zavisnosti od normalnosti raspodjele podataka. Razina statističke značajnosti u svim testovima bila je $P < 0,05$.

5. REZULTATI

5.1. Izražaj biljega mikroglija stanica u hipokampalnoj formaciji

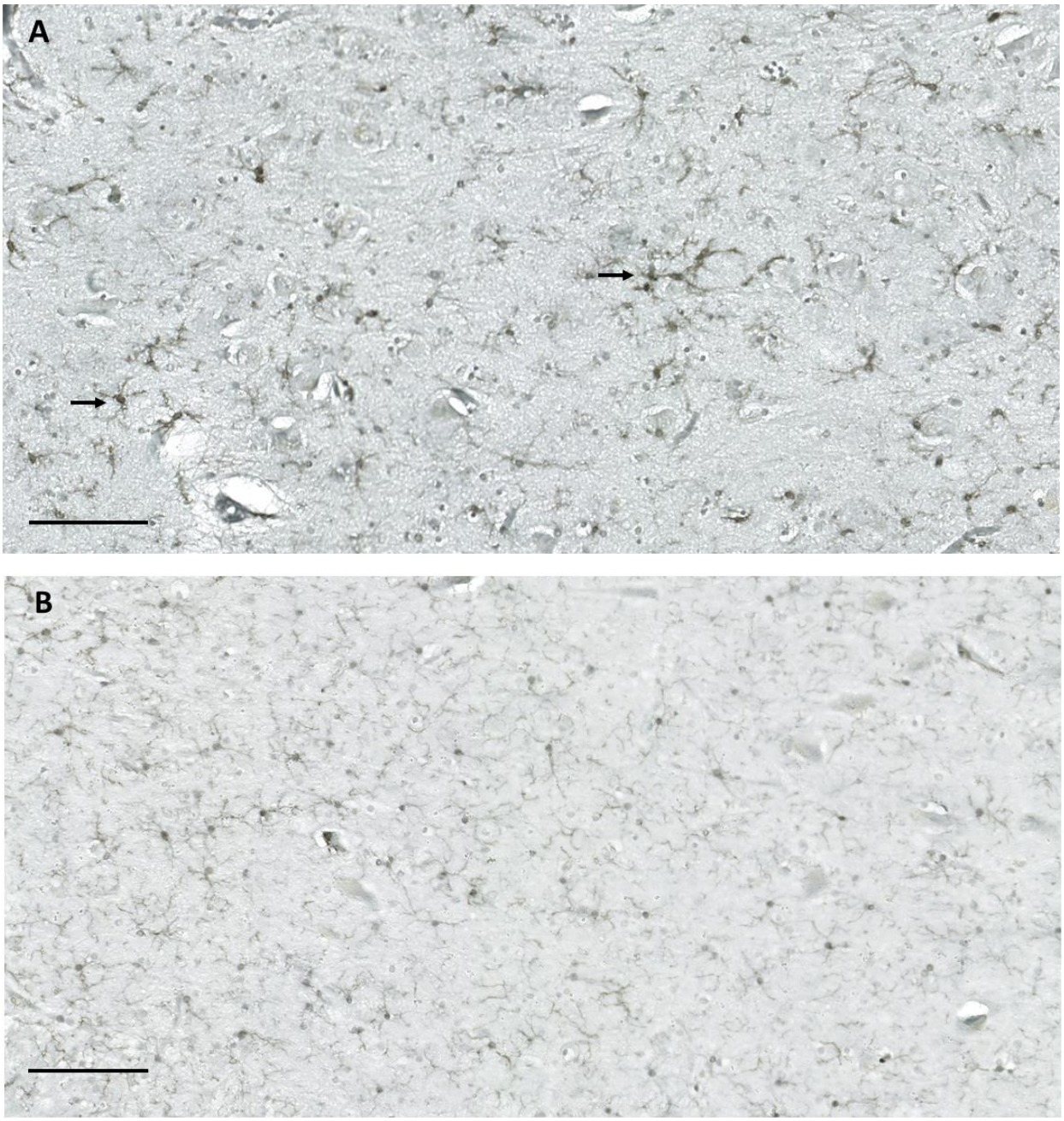
Imunohistokemijskim bojanjem analizirana je izraženost triju različitih biljega mikroglija stanica IBA1, CD68 i HLA-DR. Kombinacijom ta tri markera željeli smo analizirati mikroglija stanice u različitim stadijima aktivacije te usporediti obrasce njihove aktivnosti u hipokampalnoj formaciji (HF) bolesnika s AD-om i HC-a. Semikvantitativna procjena izražaja navedenih biljega mikroglije prikazana je u **Tablici 4**. Zbog smještaja na površini stanične membrane, upotrebom biljega IBA1 i HLA-DR dobro je vidljiva morfologija mikroglije temeljem koje se može procijeniti jesu li stanice aktivne ili su u stadiju mirovanja (140, 141). CD68 je fagocitni receptor koji je u mikrogliji uglavnom izražen na lizosomima, a vrlo malo na staničnoj membrani (140). Stoga nije pogodan za analizu morfologije stanica, ali njegova povećana ekspresija ukazuje na prisutnost aktivirane mikroglije (142).

Tablica 4. Semikvantitativna procjena biljega mikroglije IBA1 (I), HLA-DR (H), te CD68 (C).

uzorak	hCA3			CA2/3			CA1			SUB			Zbroj bodova		
	I	H	C	I	H	C	I	H	C	I	H	C	I	H	C
HC1	3	3	3	2	3	2	0	2	2	1	2	2	**6**	**10**	**9**
HC2	3	2	2	3	2	3	2	3	1	3	2	1	**11**	**9**	**7**
HC3	2	0	1	2	0	2	2	0	1	1	0	1	**7**	**0**	**5**
HC4	2	0	1	2	0	1	2	0	2	3	0	2	**9**	**0**	**6**
HC5	2	2	2	1	2	2	0	2	1	0	2	1	**3**	**8**	**6**
HC6	2	2	2	1	3	2	2	2	2	2	2	2	**7**	**9**	**8**
HC7	0	1	2	1	0	2	1	0	1	0	2	3	**2**	**3**	**8**
HC8	3	0	2	2	0	2	2	0	1	2	1	2	**9**	**1**	**7**
HC9	2	0	3	1	0	2	2	0	2	2	0	2	**7**	**0**	**9**
AD1	0	0	3	0	2	2	0	1	4	0	1	3	**0**	**4**	**12**
AD2	2	1	4	3	1	3	3	2	4	3	1	4	**11**	**5**	**15**
AD3	0	1	3	2	0	3	1	2	4	0	2	3	**3**	**5**	**13**
AD4	2	1	3	3	0	n.a.	2	3	4	3	4	4	**10**	**8**	**11**
AD5	3	3	3	2	3	3	3	3	4	3	3	3	**11**	**12**	**13**
AD6	2	2	4	3	0	3	3	3	4	2	2	3	**10**	**7**	**14**
AD7	0	2	1	3	0	3	2	4	3	4	4	4	**9**	**10**	**11**
AD8	0	4	4	1	3	3	1	4	4	0	4	4	**2**	**15**	**15**
AD9	0	2	4	3	0	3	3	2	4	2	0	3	**8**	**4**	**14**
AD10	3	0	2	3	2	3	3	3	3	3	2	4	**12**	**7**	**12**
AD11	3	3	2	3	2	2	3	3	2	2	3	3	**11**	**11**	**9**

5.1.1. IBA1

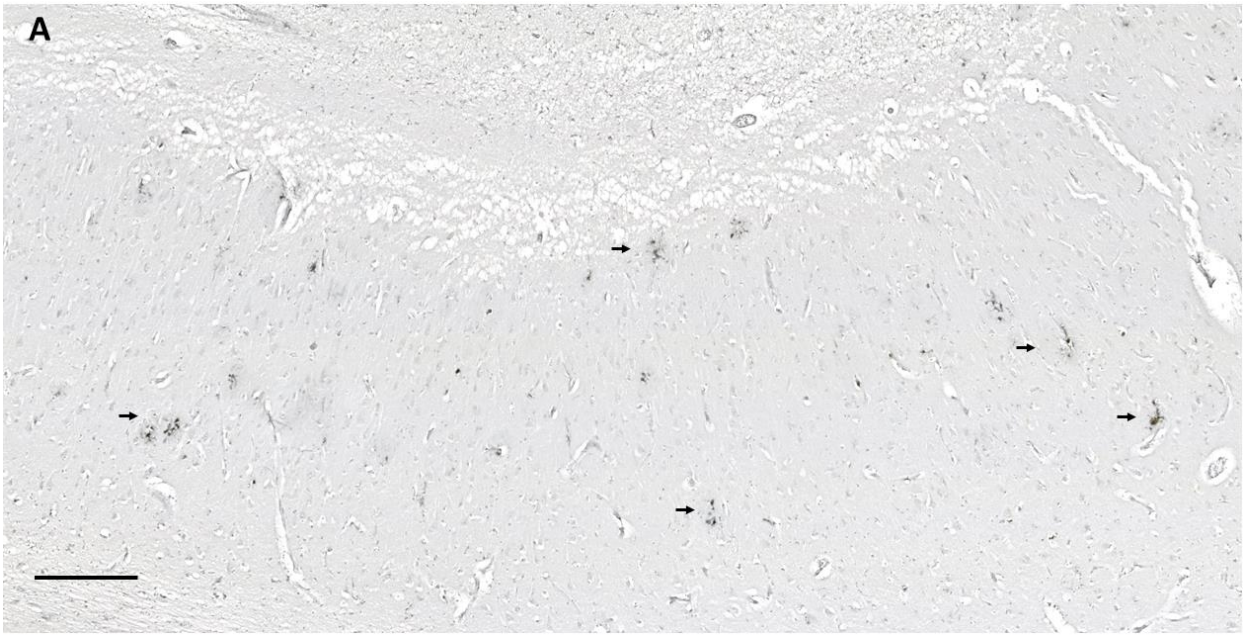
IBA1 biljegom jasno smo vidjeli morfologiju mikroglije, a u analiziranim uzorcima uz ponegdje nepravilne i stanice zadebljane some, IBA1 biljegom poglavito smo vidjeli bogato razgranate stanice (**Slika 6**). Tim biljegom nismo vidjeli mnogo intenzivnih signala u nakupinama kao što je to bio slučaj i s CD68 i HLA-DR. Izraženost biljega IBA1 u AD skupini ispitanika bila je najviša u CA2/3, a najniža u hCA3 polju, dok je u HC skupini najveće vrijednosti dostigla u hCA3, a najniže u DG, CA1 i WM-u. Unatoč naizgled nešto intenzivnijoj imunoreaktivnosti u AD skupini ispitanika, sveukupno nije bilo statistički značajne razlike u izraženosti IBA1 biljega između AD i HC skupine ni u jednom polju HF-a, niti kada se gledala ukupna izraženost biljega HF-a ($p = 0,32$; **Tablica 4**, **Slika 9**).

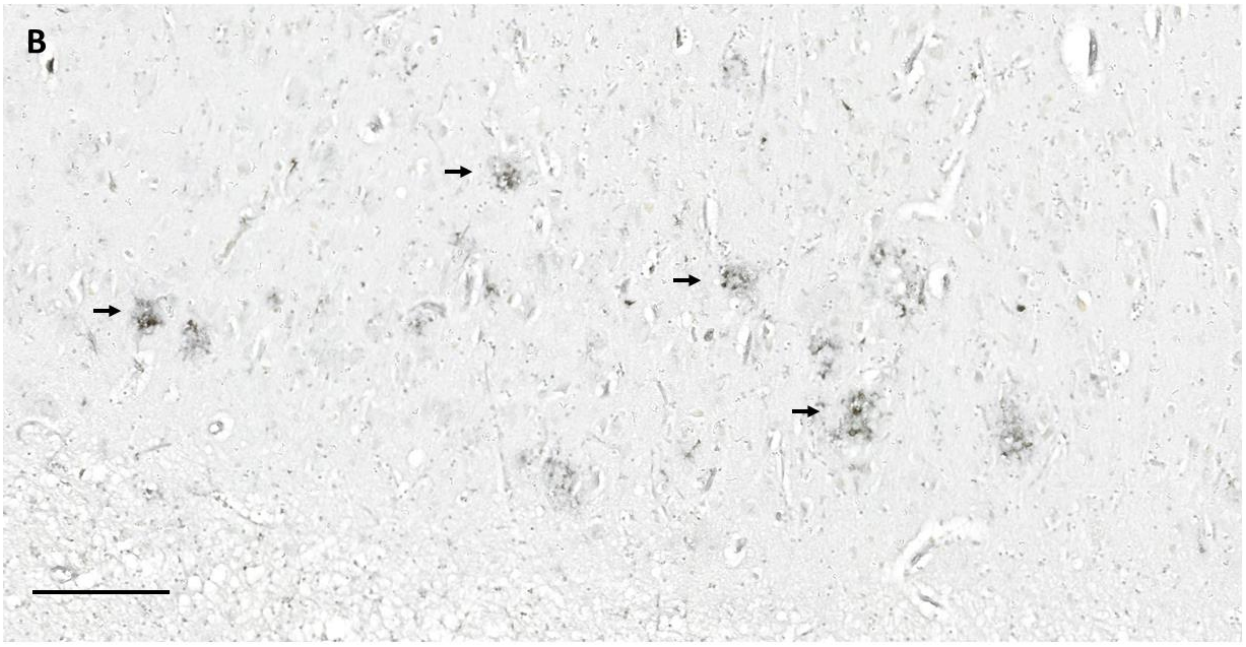


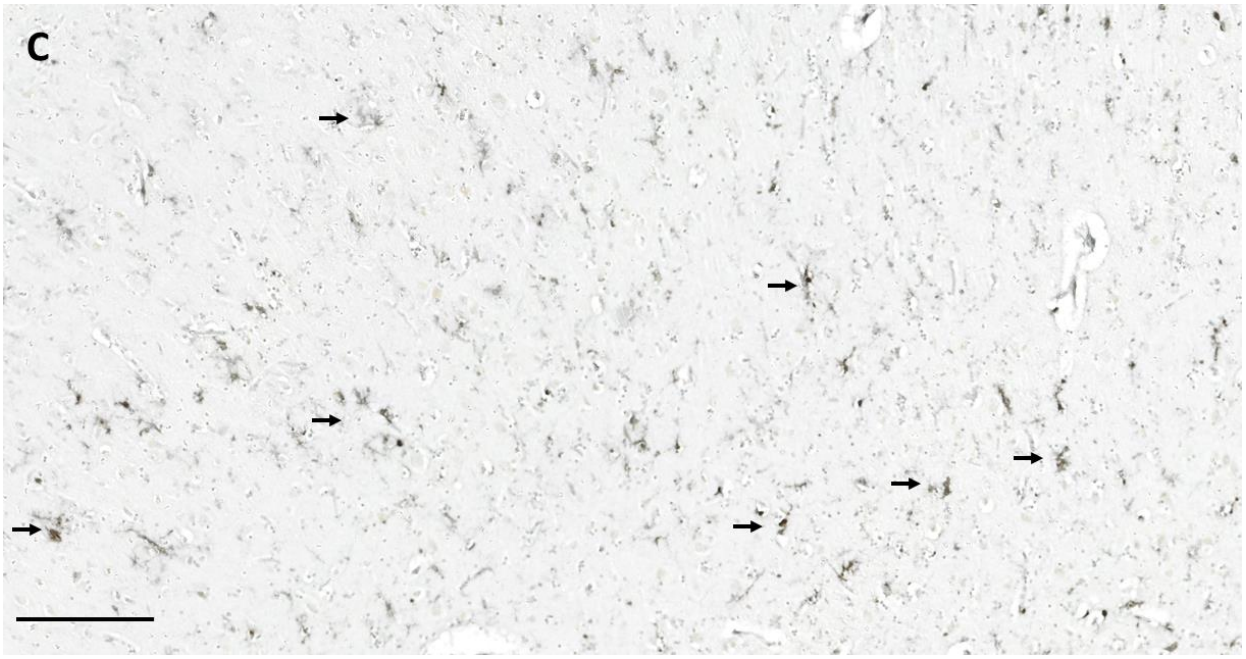
Slika 6. Izražaj biljega IBA1 u hCA3 polju u AD (**A**) i HC (**B**) uzorku. (**A**) Strelice pokazuju neke jače aktivirane mikroglija stanice. (**B**) Bogato razgranata mikroglija imunoreaktivna na IBA1 biljeg. Mjerilo = 100 µm.

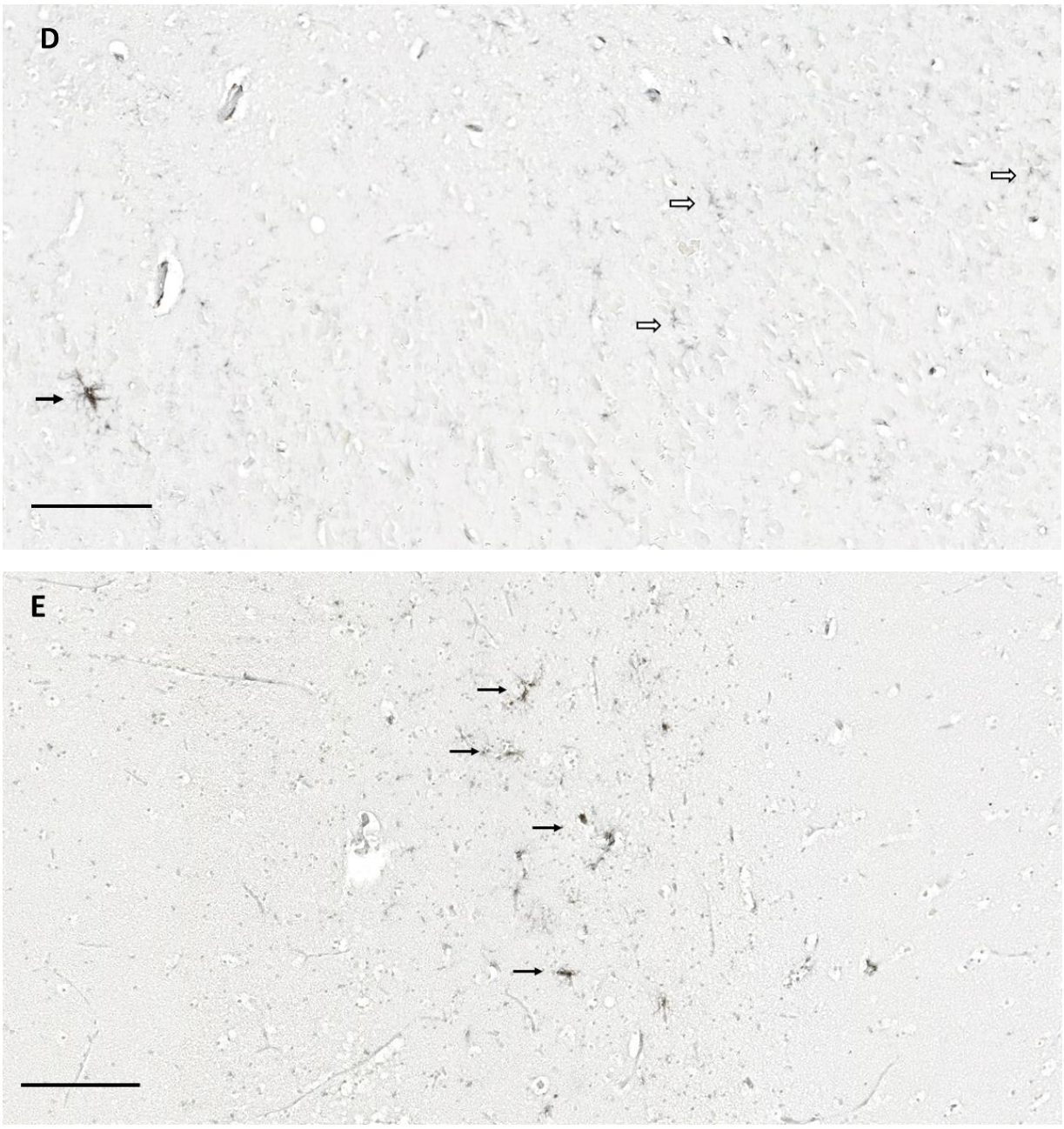
5.1.2. HLA-DR

HLA-DR pripada skupini receptora glavnog kompleksa tkivne podudarnosti (*Major histocompatibility complex*, MHC-II) te se njegov izražaj na površini mikroglije povećava prilikom aktivacije stanice. Zbog smještaja na membrani stanica, upotrebom HLA-DR biljega također je dobro vidljiva morfologija mikroglije. Za razliku od IBA1 signala, HLA-DR biljegom vidjeli smo stanice nepravilnih oblika, zadebljane some, te često u obliku nepravilnih nakupina povećane imunoreaktivnosti (**Slika 7**), što je upućivalo na povećanu aktivnost stanica. Unatoč opaženom pojačanom izražaju HLA-DR biljega u AD ispitanika, razlika ukupne izraženosti po uzorku nije dosegla statističku značajnost ($p = 0,08$; **Slika 9**; **Tablica 4**). Značajno veća izraženost HLA-DR receptora evidentirana je u CA1 polju AD skupine ispitanika ($p = 0,003$). U HC skupini ispitanika HLA-DR biljeg bio je najizraženiji u WM-u, a najslabiji u poljima DG i CA1. Za razliku od kontrolne skupine, u AD skupini je izražaj toga biljega bio najveći u CA1, a najmanji u CA2/3 polju.




B

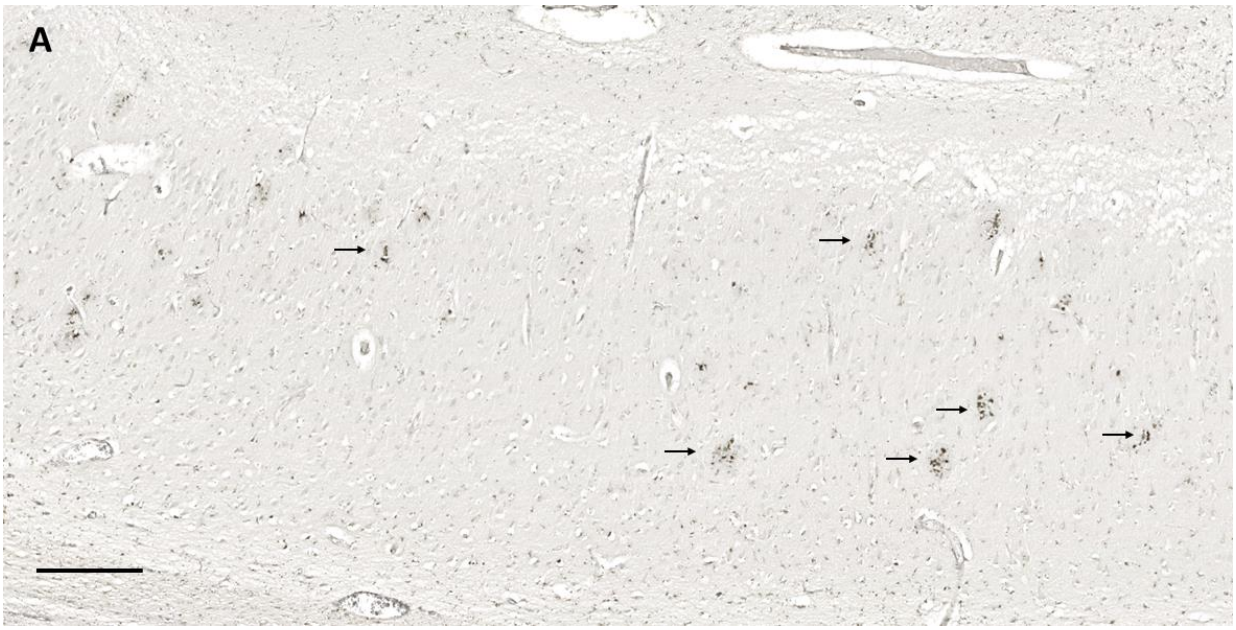

C

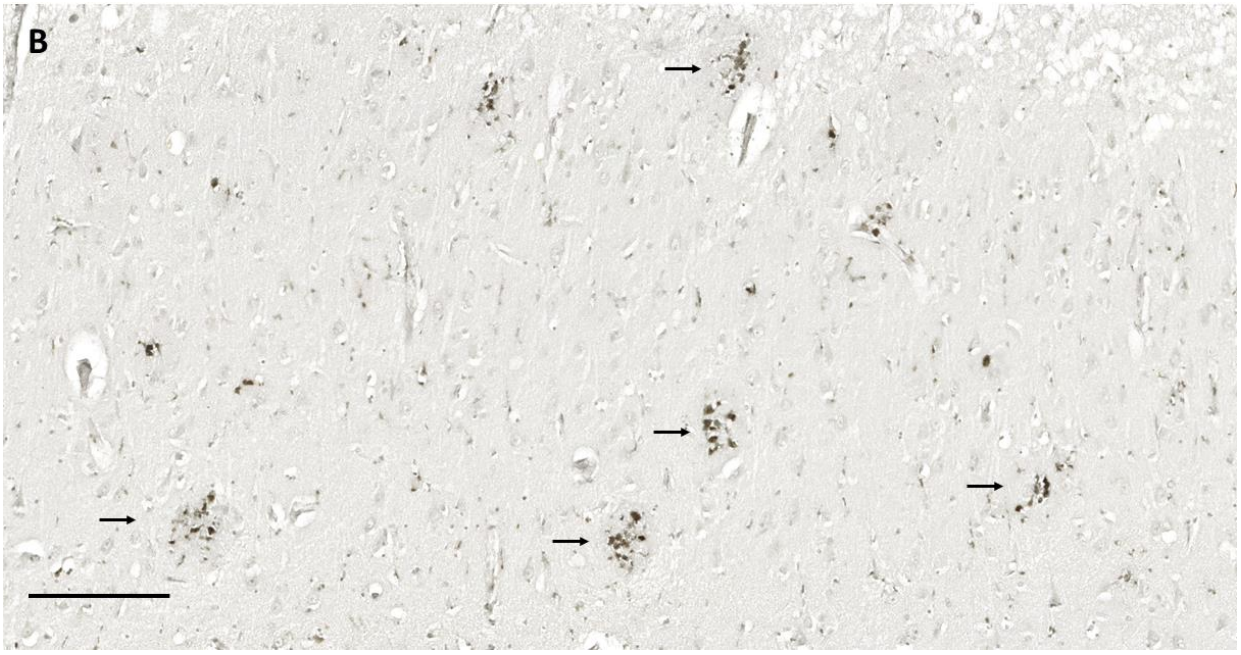


Slika 7. Izražaj biljega HLA-DR u CA1 (**A**, mjerilo = 300 µm), SUB (**B** i **C**, mjerilo = 200 µm) AD uzoraka te u hCA3 (**D**, mjerilo = 200 µm) i DG (**E**, mjerilo = 200 µm) HC uzorka. (**A**) i (**B**) strelice pokazuju aktivirane mikroglije u nakupinama. (**C**) i (**E**) crne strelice pokazuju aktiviranu mikrogliju i (**D**) bijele strelice pokazuju slabije aktivirane stanice.

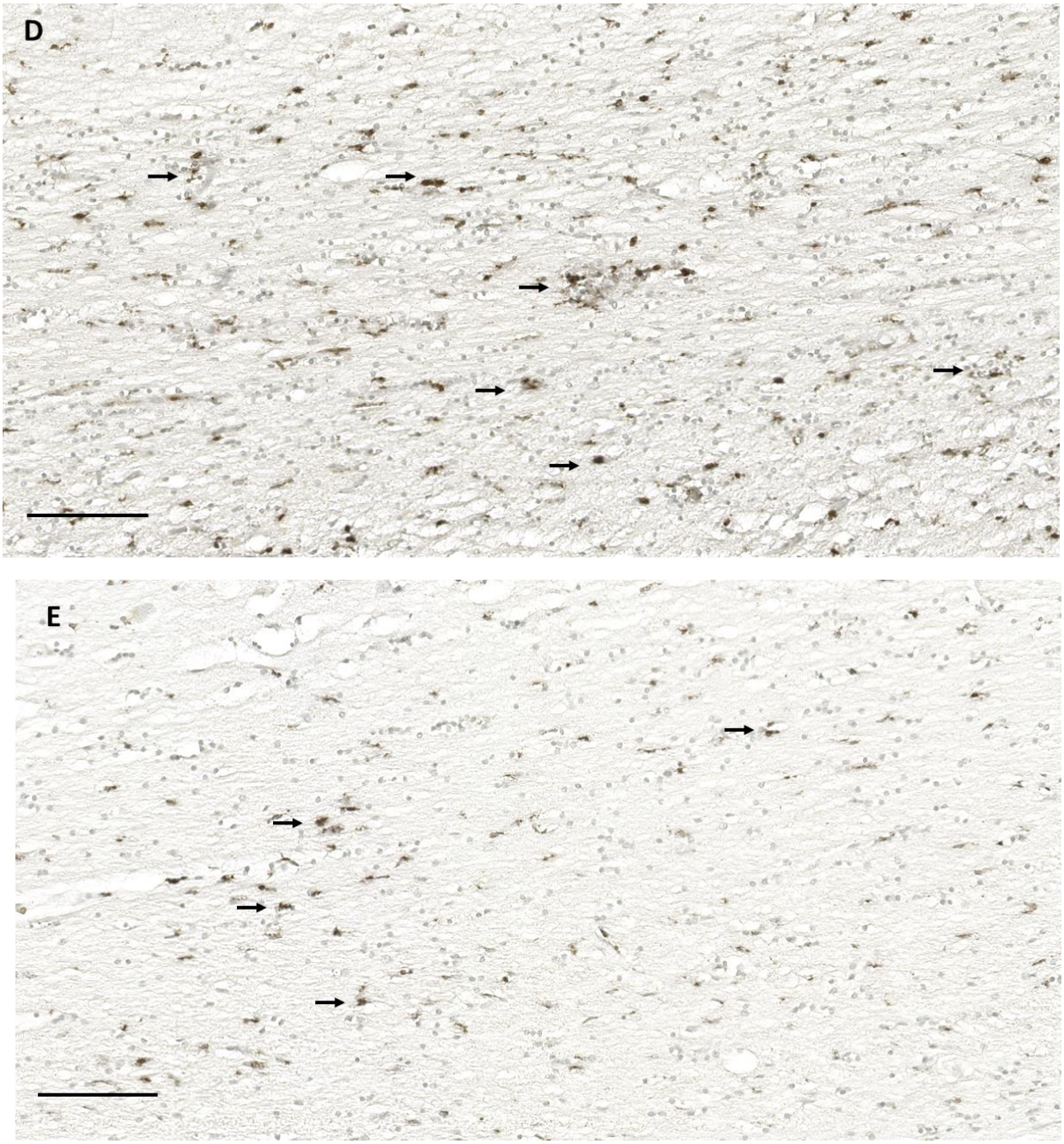
5.1.3. CD68

CD68 je fagocitni receptor koji je u mikrogliji uglavnom izražen na lizosomima, a vrlo malo na staničnoj membrani. Kao i kod HLA-DR receptora, njegova povećana ekspresija obilježje je aktivirane mikroglije. Za procjenu izraženosti CD68 biljega upotrebljena je slična, ali malo promijenjena semikvantitativna skala budući da se tim biljegom ne može jasno vidjeti morfologija stanica. U analiziranim uzorcima CD68 receptor je bio vidljiv kao difuzni točkasti signal ili katkad u obliku nakupina, a tada uglavnom u AD ispitanika (**Slika 8**). Biljeg CD68 bio je značajno jače izražen u AD skupini u svim analiziranim poljima osim u WM-u (DG $p = 0,01$; hCA3 $p = 0,03$; CA1 $p < 0,0001$; CA2/3 $p = 0,0045$; SUB $p < 0,0001$), te kada se HF promatrala u cjelini ($p < 0,0001$) (**Slika 9**). U AD skupini najjače je CD68 bio izražen u CA1, a najmanje u CA2/3 polju, dok je u HC skupini izražaj bio najveći u WM-u, a najmanji u CA1 polju.

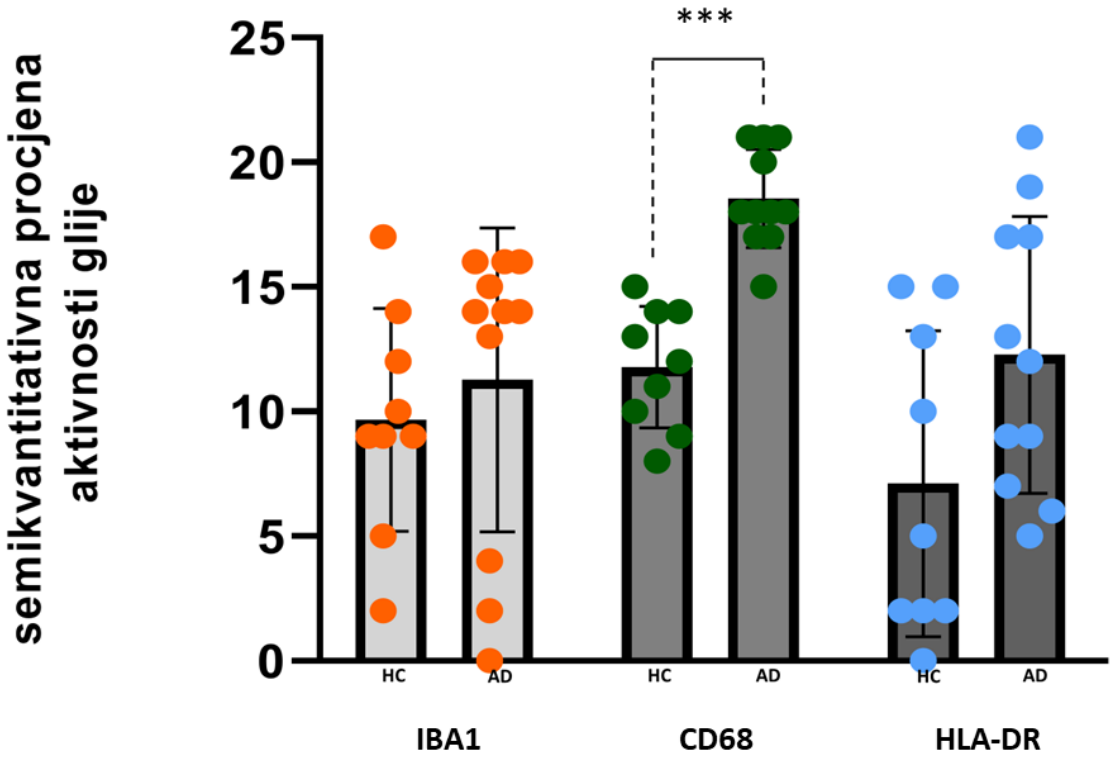



B


C



Slika 8. Izražaj CD68 u CA1 polju odabranog uzorka HF-a jednog AD ispitanika (**A**, mjerilo = 300 µm i **B**, mjerilo = 200 µm) i jednog ispitanika iz HC skupine (**C**, mjerilo = 200 µm), te u WM-u HF-a jednoga AD (**D**, mjerilo 100 µm) i jednoga HC (**E**, mjerilo 100 µm) ispitanika. Strelice na slikama (**A**) i (**B**) pokazuju točkasti signal u nakupinama (grozdovima), dok je u (**C**) difuzni točkasti signal imunoreaktivnosti na CD68 slabijeg intenziteta.

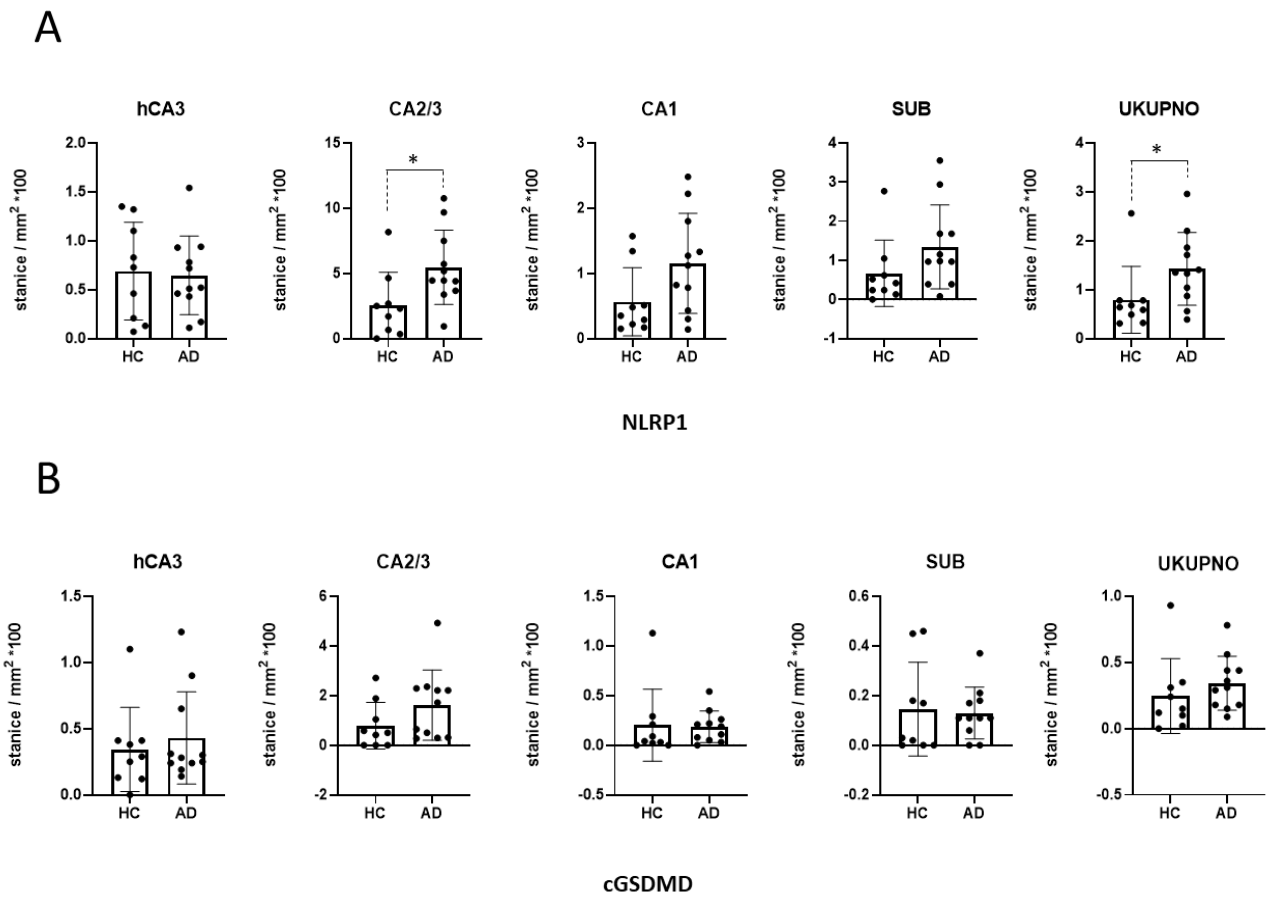


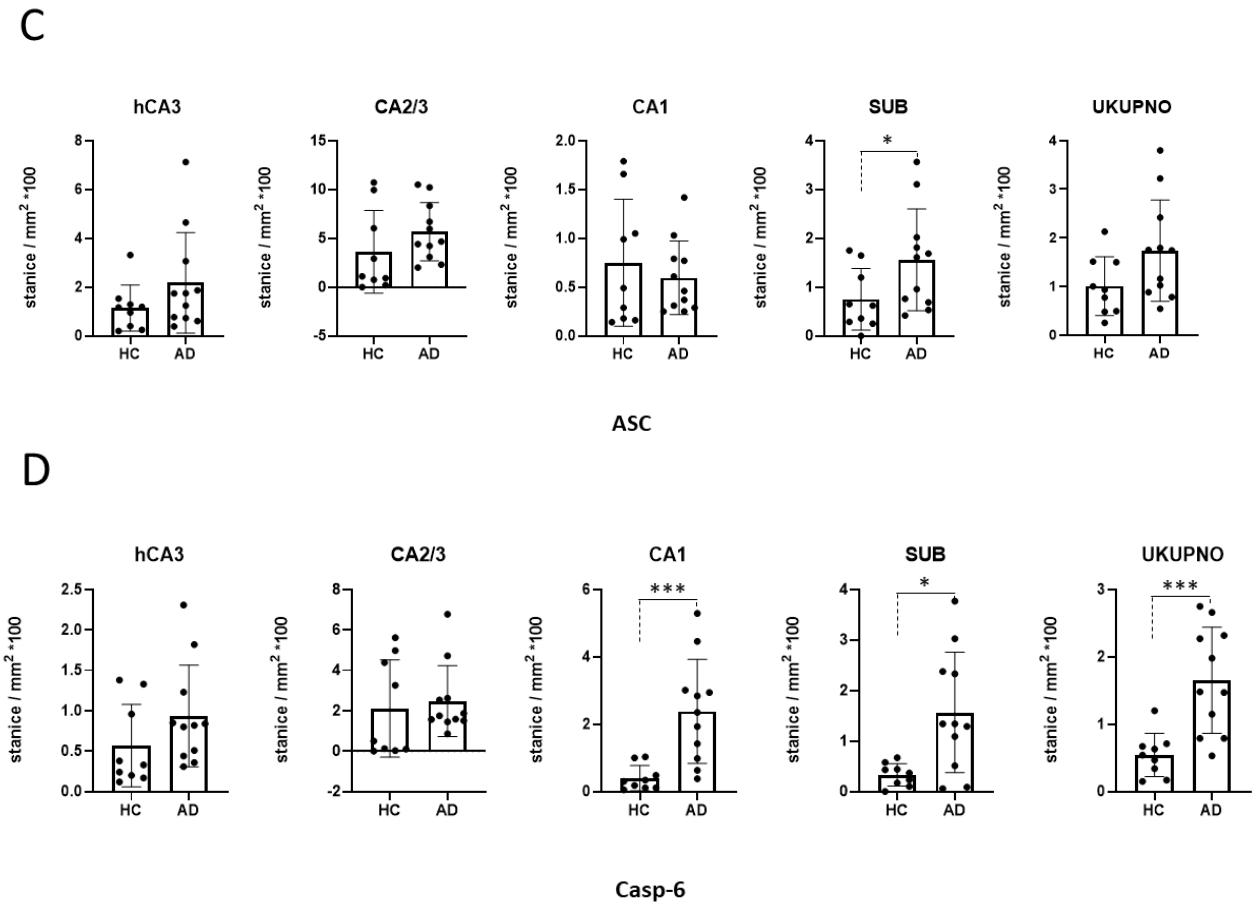
Slika 9. Semikvantitativna procjena izraženosti biljega IBA1, HLA-DR i CD68 mikroglija stanica u nasumično odabranim rezovima hipokampalne formacije kontrolnih (HC) i mozgova osoba s kliničkom dijagnozom Alzheimerove bolesti (AD) koja je potvrđena detaljnom postmortalnom neuropatološkom analizom. Prikazane su ukupne vrijednosti semikvantitativne procjene po svakom uzorku kako je opisano u Metodama. Biljeg CD68 značajno je jače izražen u HF-u AD skupine ispitanika ($p < 0,0001$).

5.2. Izražaj biljega aktivacije NLRP1 inflamasoma

Za procjenu aktivacije NLRP1 inflamasoma u HF-u analiziran je izražaj proteina NLRP1, ASC te pocijepanih oblika GSDMD-a i Casp-6, a rezultati procjene izražaja navedenih proteina prikazani su u **Tablici 5**. Ukupan izražaj proteina NLRP1 i Casp-6 po uzorku bio je značajno veći u AD skupini u odnosu na kontrole (NLRP1 $p = 0,03$; Casp-6 $p = 0,0007$) (**Slika 10**), dok razlike u intenzitetima imunoreaktivnosti ASC i cGSDMD proteina nisu dosegle statističku značajnost (ASC $p = 0,07$; cGSDMD $p = 0,15$). Imunoreaktivnost na NLRP1 bila je značajno veća u CA2/3 polju AD skupine ($p = 0,02$), dok u ostalim analiziranim poljima razlike nisu bile značajne. Osim

veće aktivnosti aktivirane Casp-6 ukupno promatrajući u cijeloj HF u AD skupini, izražaj aktivirane Casp-6 bio je značajno veći i u CA1 polju (p = 0,0005) i subikulu (p = 0,02) uzoraka HF-a AD skupine ispitanika. Izražaj ASC proteina bio je značajno veći samo u subikulu ispitanika s AD-om (p = 0,04), dok razlike u izraženosti cGSDMD proteina ni u jednom ispitivanom polju nisu dosegle statističku značajnost. Osim toga, općenito gledano, izražaj cGSDMD proteina bio je najslabiji od svih ispitivanih proteina. Najjača cGSDMDimunoreaktivnost zabilježena je u CA2/3 polju, a najniža u subikulu u obje skupine ispitivanih uzoraka. Svi analizirani proteini najjače su bili izraženi u CA2/3 polju u obje skupine. Casp-6 je osim toga najizraženiju imunoreaktivnost imala u piramidnim neuronima CA1 polja AD skupine ispitanika. Nasuprot tome, izražaj ASC proteina u CA1 polju bio je vidno slabiji. U CA1 polju HC skupine uzoraka signal imunoreaktivnosti na aktiviranu kaspazu-6 bio je vrlo slab.

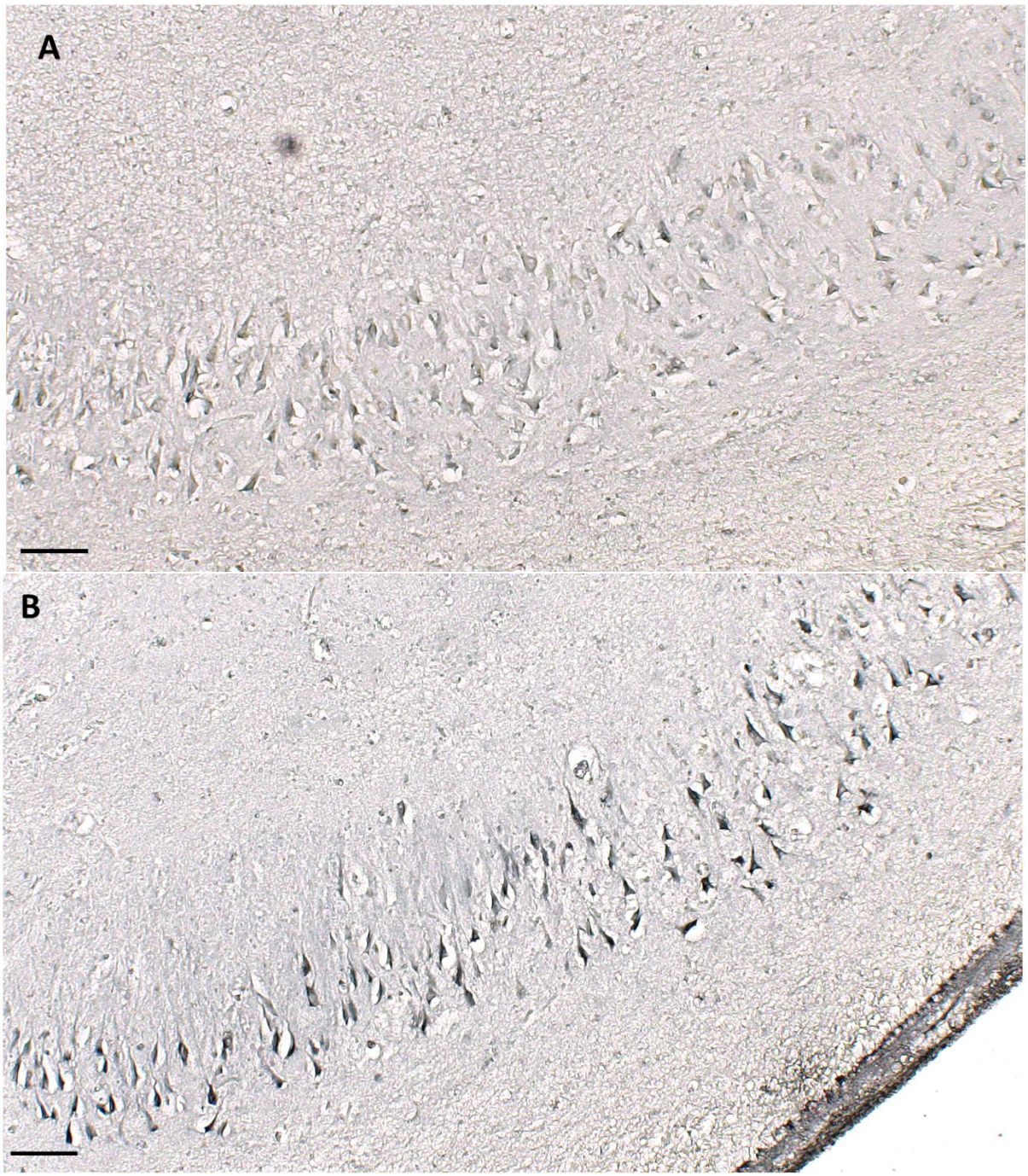




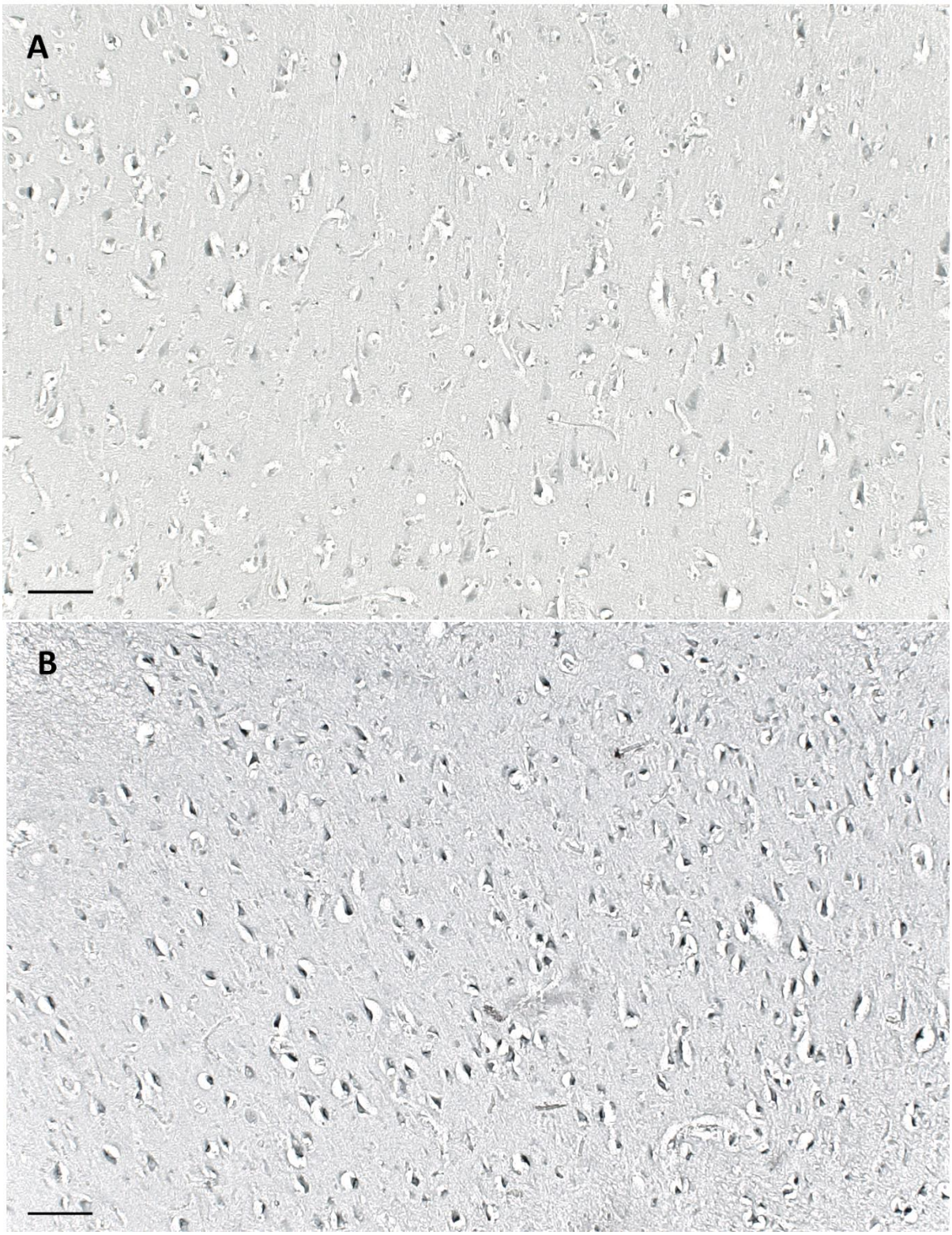
Slika 10. Stupanj imunoreaktivnosti NLRP1 (**A**), cGSDMD (**B**), i ASC proteina (**C**) te kaspaze-6 (**D**) u analiziranim poljima HF-a. (**A**) Ukupan izražaj proteina NLRP1 po slučajno odabranom uzorku bio je značajno veći u AD skupini u odnosu na kontrole ($p = 0,03$). NLRP1 imunoreaktivnost također je bila značajno veća u CA2/3 polju AD skupine ($p = 0,02$), dok u drugim poljima razlike nisu bile značajne. (**B**) Razlike u izraženosti cGSDMD proteina nisu dosegle statističku značajnost ni u jednom analiziranom polju HF-a niti kada se analizirala HF u cjelini. (**C**) Izraženost ASC proteina bila je značajno veća u AD skupini u subikulu ($p = 0,04$), dok razlike u ostalim poljima, kao niti sveukupno u HF-u nisu dosegle statističku značajnost. (**D**) Izražaj aktivirane kaspaze-6 bio je značajno veći u AD skupini kad su se analizirala sva polja zajedno ($p = 0,0007$), kao i u CA1 polju ($p = 0,0005$) i subikulu ($p = 0,02$).

Tablica 5. Rezultati imunohistokemijskog bojanja za NLRP1, ASC, cGSDMD i aktiviranu kaspazu-6.

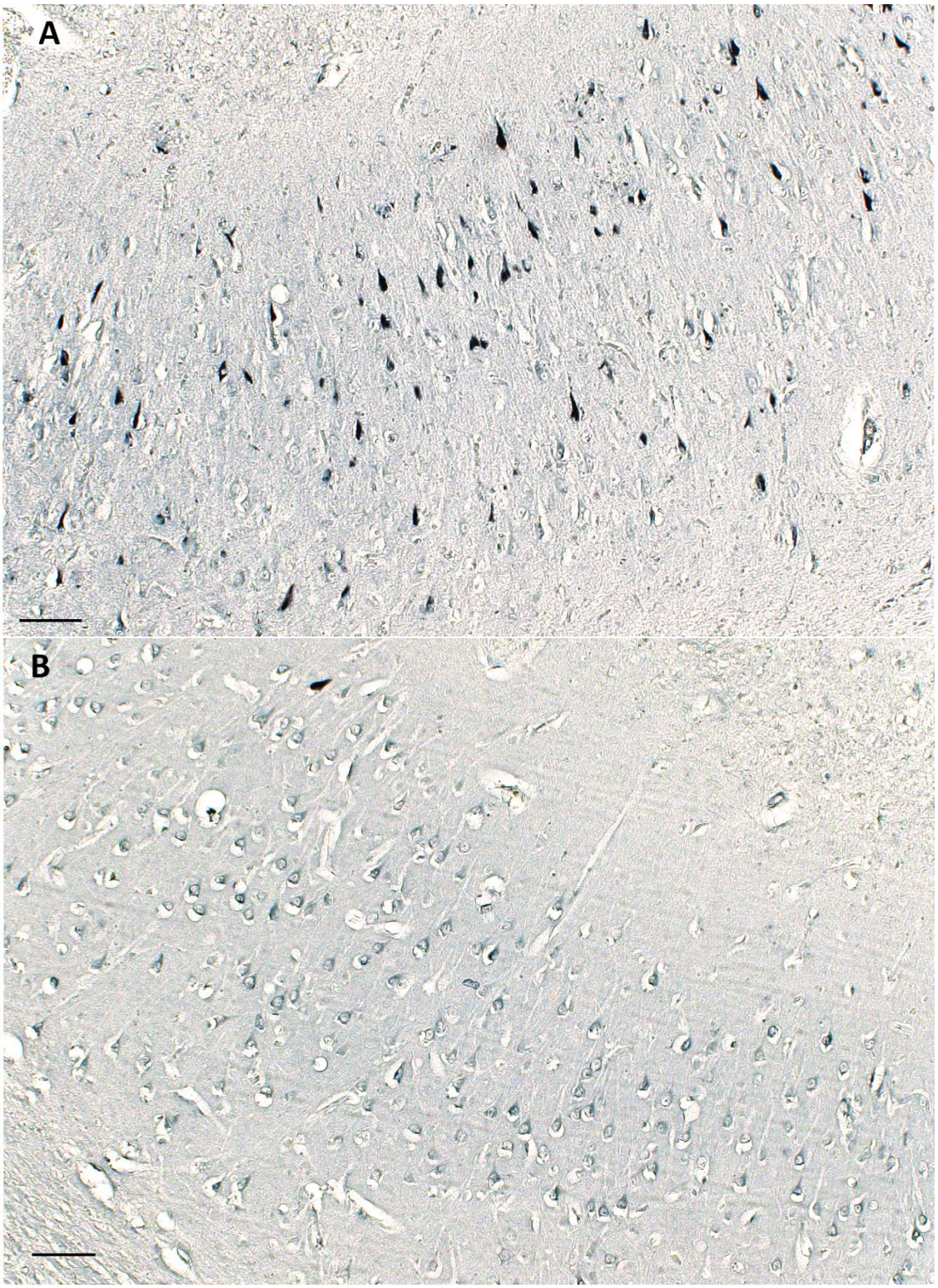
BROJ UZORKA	hCA3				POVRŠINA	CA2/3				POVRŠINA	CA1				POVRŠINA	SUB				POVRŠINA	S				POVRŠINA
	POZITIVNE STANICE/POVRŠINA*100					POZITIVNE STANICE/POVRŠINA*100					POZITIVNE STANICE/POVRŠINA*100					POZITIVNE STANICE/POVRŠINA*100					POZITIVNE STANICE/POVRŠINA*100				
	NLRP1	ASC	cGSDMD	Casp-6	mm^2	NLRP1	ASC	cGSDMD	Casp-6	mm^2	NLRP1	ASC	cGSDMD	Casp-6	mm^2	NLRP1	ASC	cGSDMD	Casp-6	mm^2	NLRP1	ASC	cGSDMD	Casp-6	mm^2
HC1	0,07	0,20	0,00	0,20	5981	0,67	0,75	0,00	0,03	3449	1,34	1,66	0,00	1,00	8421	0,00	0,00	0,00	0,00	0	0,78	1,00	0,00	0,54	17852
HC2	1,10	1,17	0,41	1,38	7837	0,00	0,00	0,00	0,00	0	0,15	0,16	0,03	0,48	10702	0,42	0,36	0,03	0,37	14885	0,49	0,48	0,12	0,71	33424
HC3	0,21	0,25	0,41	0,12	7738	0,34	0,21	0,42	0,10	11277	0,17	0,29	0,29	0,05	17299	0,52	0,25	0,17	0,43	12825	0,31	0,25	0,31	0,17	49139
HC4	1,32	0,96	0,25	0,33	3953	8,17	6,04	1,04	3,26	2302	1,57	0,99	0,04	0,34	10149	2,77	1,20	0,02	0,44	10065	2,56	1,50	0,15	0,63	26468
HC5	0,73	1,29	1,10	1,33	7362	2,68	2,93	2,71	4,98	6829	0,51	0,49	1,13	1,03	22223	0,24	0,65	0,18	0,23	23678	0,68	0,93	0,93	1,20	60092
HC6	0,83	0,40	0,29	0,17	4201	2,50	1,11	0,50	0,50	1803	0,22	0,14	0,02	0,11	13001	0,62	1,65	0,46	0,67	10486	0,59	0,77	0,24	0,34	29490
HC7	0,13	3,32	0,38	0,96	4486	4,64	9,96	1,88	4,39	1596	0,35	1,05	0,09	0,18	12506	1,05	1,75	0,45	0,58	9121	0,78	2,13	0,35	0,67	28108
HC8	0,46	1,19	0,12	0,38	3445	2,31	10,73	0,58	5,62	1388	0,29	1,79	0,21	0,30	6647	0,13	0,62	0,00	0,10	15423	0,32	1,51	0,10	0,47	26903
HC9	1,35	1,53	0,13	0,24	5412	1,71	0,92	0,00	0,13	3916	0,48	0,18	0,00	0,11	14360	0,24	0,29	0,00	0,17	14239	0,64	0,49	0,02	0,15	37926
AD1	0,93	1,74	0,24	1,82	6247	3,38	5,97	2,36	4,72	2162	0,43	0,61	0,22	1,93	6441	0,39	1,61	0,21	2,38	6131	0,87	1,79	0,44	2,32	20980
AD2	1,54	7,13	1,23	2,31	3897	10,76	10,51	4,92	6,78	1180	2,22	0,77	0,21	3,01	4680	2,94	3,11	0,37	1,34	9659	2,96	3,80	0,78	2,27	19416
AD3	0,17	3,06	0,65	0,82	4018	3,67	3,09	1,72	1,57	2619	0,14	0,29	0,05	0,63	11055	0,39	0,53	0,11	0,09	11419	0,56	1,02	0,31	0,53	29111
AD4	0,72	0,61	0,19	0,36	12189	7,49	4,23	0,30	1,87	2671	2,48	0,37	0,03	2,35	7269	1,15	0,76	0,00	1,09	15626	1,71	0,88	0,09	1,15	37754
AD5	0,52	0,73	0,14	0,31	7351	9,68	8,34	2,29	1,59	1571	1,12	1,42	0,54	2,94	7029	0,97	1,69	0,11	1,29	10083	1,41	1,75	0,36	1,48	26034
AD6	0,94	1,75	0,24	0,44	8899	5,72	4,68	0,27	1,51	2588	1,80	0,25	0,00	1,42	5571	1,68	1,81	0,11	0,51	7837	1,86	1,74	0,15	0,79	24894
AD7	0,78	4,65	0,90	1,23	4881	5,18	10,22	2,21	2,54	2720	0,82	1,03	0,19	2,84	7956	3,55	2,02	0,11	1,34	7240	2,20	3,22	0,56	1,98	22797
AD8	0,51	0,77	0,25	0,85	8738	4,46	2,30	0,50	0,86	3386	1,27	0,46	0,35	5,29	8296	0,97	0,42	0,17	3,03	6921	1,35	0,78	0,29	2,75	27342
AD9	0,11	1,24	0,30	0,80	3622	0,95	4,41	2,21	1,75	1995	0,78	0,31	0,26	4,46	6168	0,08	0,96	0,18	2,33	7741	0,39	1,16	0,44	2,66	19527
AD10	0,46	0,39	0,28	0,51	4356	4,45	2,00	0,64	1,45	4201	0,30	0,25	0,11	0,98	21832	1,68	0,69	0,06	3,77	6501	1,04	0,54	0,18	1,47	36890
AD11	0,43	1,87	0,31	0,84	7476	4,41	6,71	0,31	2,62	2562	1,33	0,79	0,08	0,38	6547	0,98	3,57	0,00	0,06	3276	1,33	2,42	0,18	0,79	19862



Slika 11. Izraženost NLRP1 biljega u CA2/3polju HF-a jednog odabranog HC (**A**) i AD (**B**) uzorka. Mjerilo = 100 µm.



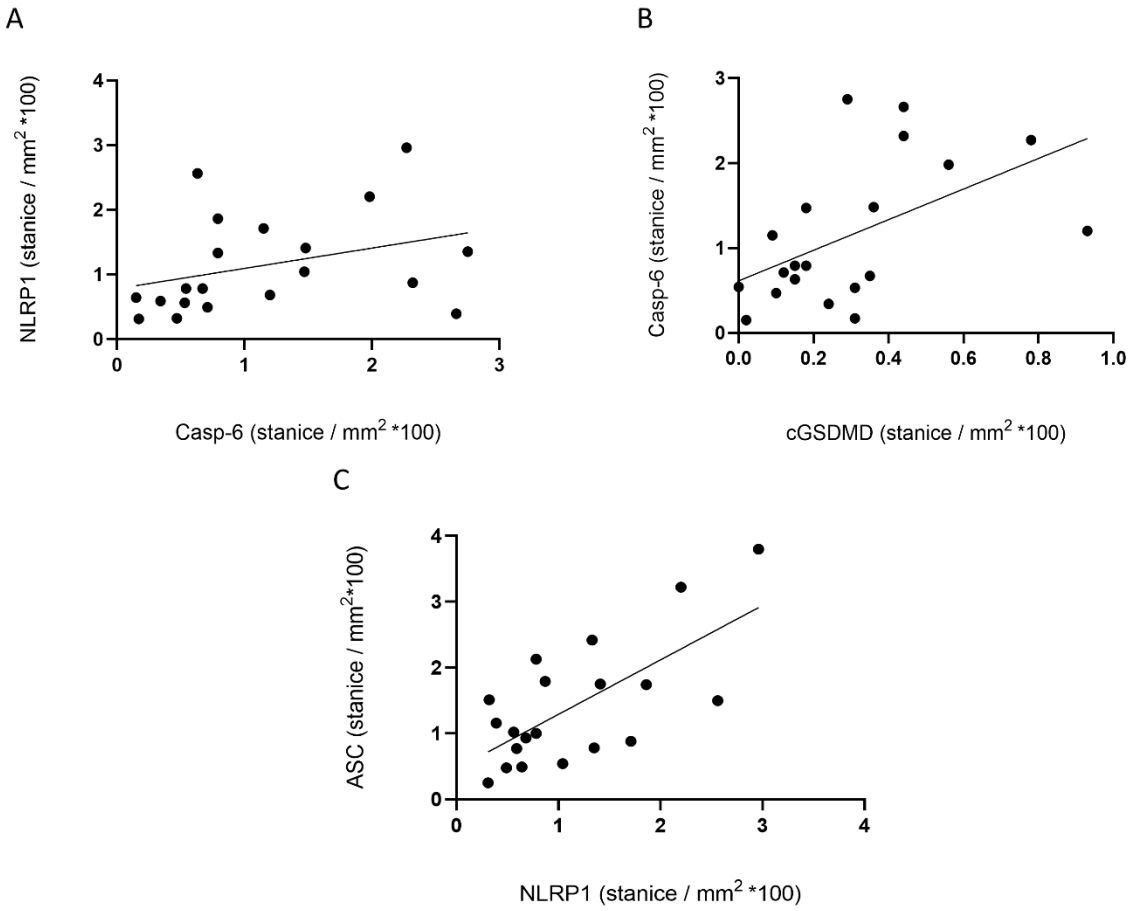
Slika 12. Izražaj ASC proteina u subikulu HF-a jednog odabrano HC (**A**) i jednog AD (**B**) uzorka. Mjerilo = 100 µm.



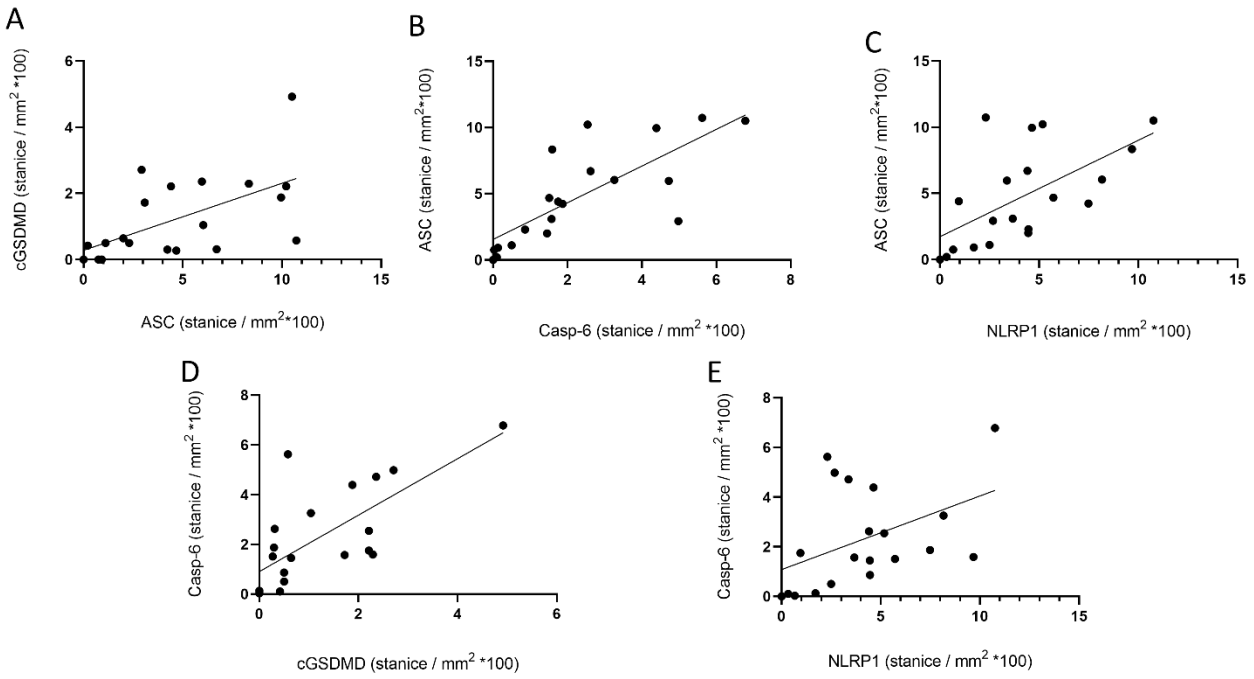
Slika 13. Izraženost aktivirane kaspaze-6 u CA1 polju jednog odabranog AD (**A**) i jednog HC (**B**) uzorka. Mjerilo = 100 µm.

5.3. Korelacije biljega aktivacije inflamasoma

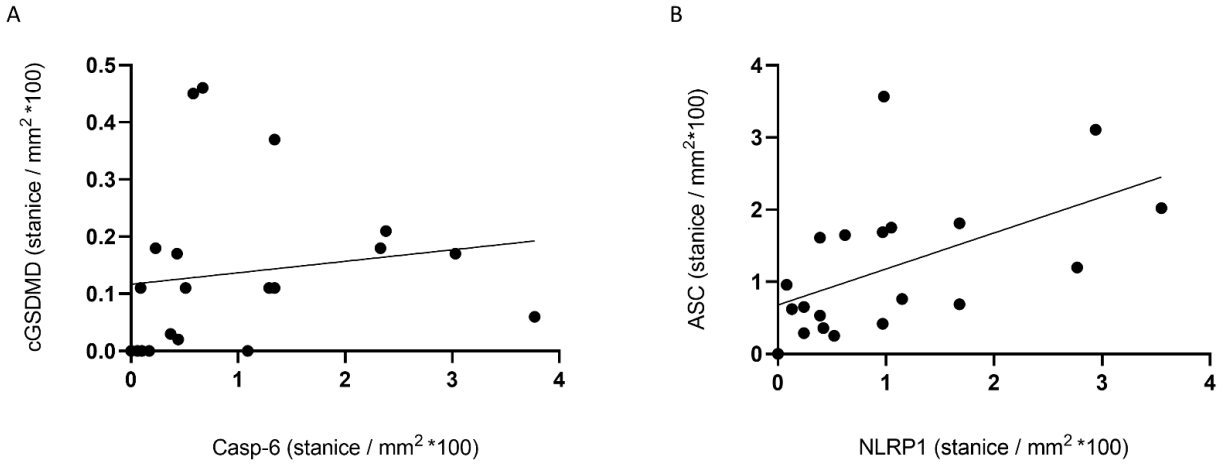
Kako bi se analizirala međuovisnost izraženosti pojedinih proteina uključenih u proces aktivacije NLRP1 inflamasoma, analizirana je korelacija sveukupne izraženosti proteina u analiziranim uzorcima, kao i po individualnim poljima HF-a. Pronađena je značajna pozitivna korelacija između ukupnog izražaja NLRP1 i ASC proteina (Spearman r (R_S) = 0,54; p = 0,01), između NLRP1 i Casp-6 (R_S = 0,49; p = 0,03) te između Casp-6 i cGSDMD proteina (R_S = 0,57; p = 0,01) (**Slika 14**). Kada se promatrao izražaj markera po pojedinim poljima HF-a, najviše pozitivnih korelacija bilo je u CA2/3 polju (**Slika 15**). U CA2/3 polju značajno su pozitivno korelirale izraženosti NLRP1 i ASC (R_S = 0,65; p = 0,002), ASC i cGSDMD (R_S = 0,59; p = 0,01), NLRP1 i Casp-6 (R_S = 0,50; p = 0,02), Casp-6 i ASC (R_S = 0,85; p < 0,0001) te cGSDMD i Casp-6 (R_S = 0,72; p = 0,0003). U hCA3 pronašli smo značajne korelacije između cGSDMD i Casp-6 (R_S = 0,57; p = 0,01), ASC i cGSDMD (R_S = 0,48; p = 0,03) te Casp-6 i ASC proteina (R_S = 0,68; p = 0,0009). U SUB značajno su korelirali NLRP1 i ASC (R_S = 0,65; p = 0,0019) te cGSDMD i Casp-6 (R_S = 0,51; p = 0,022) (**Slika 16**) a u CA1 samo NLRP1 i Casp-6 (R_S = 0,54; p = 0,01) (**Slika 17**).



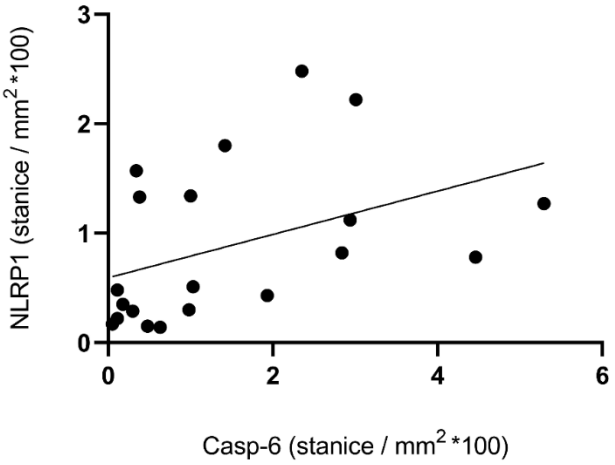
Slika 14. Prikaz korelacije ukupne izraženosti Casp-6 i NLRP1 (**A**; r = 0,49; p = 0,03), cGSDMD-a i Casp-6 (**B**; r = 0,57; p = 0,01) te NLRP1 i ASC proteina (**C**; r = 0,54; p = 0,01) u svim analiziranim poljima HF-a zajedno.



Slika 15. Pozitivna korelacija cGSDMD i ASC (**A**, r = 0,59; p = 0,01), Casp-6 i ASC (**B**; r = 0,85; p < 0,0001), NLRP1 i ASC (**C**; r = 0,65; p = 0,0019), cGSDMD i Casp-6 (**D**; r = 0,72; p = 0,0003) te NLRP1 i Casp-6 (**E**; r = 0,50; p = 0,02) u CA2/3 polju HF.



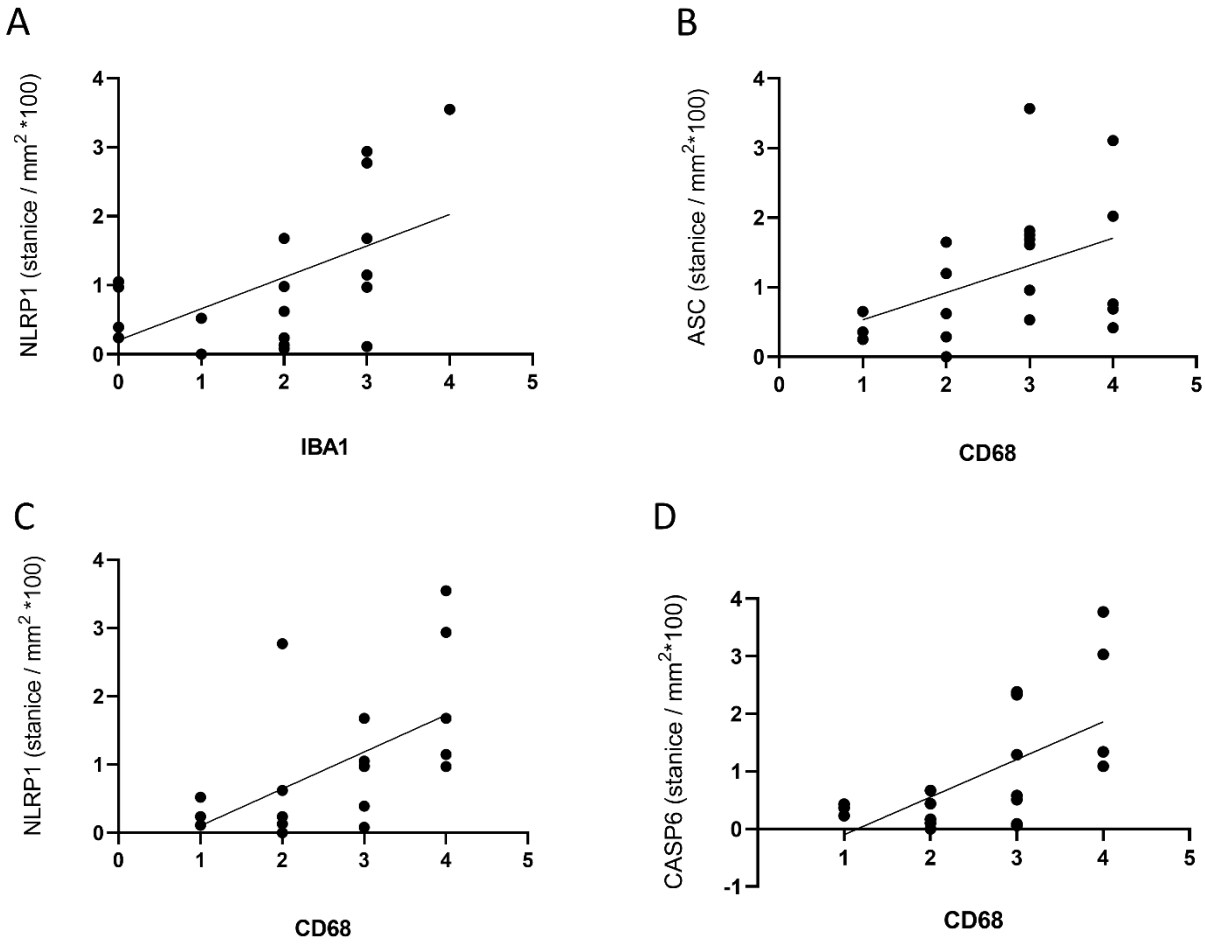
Slika 16. Prikaz korelacije izraženosti Casp-6 i cGSDMD-a (**A**; r = 0,51; p = 0,022) te izraženosti NLRP1 i ASC proteina (**B**; r = 0,65; p = 0,0019) u subikulu.



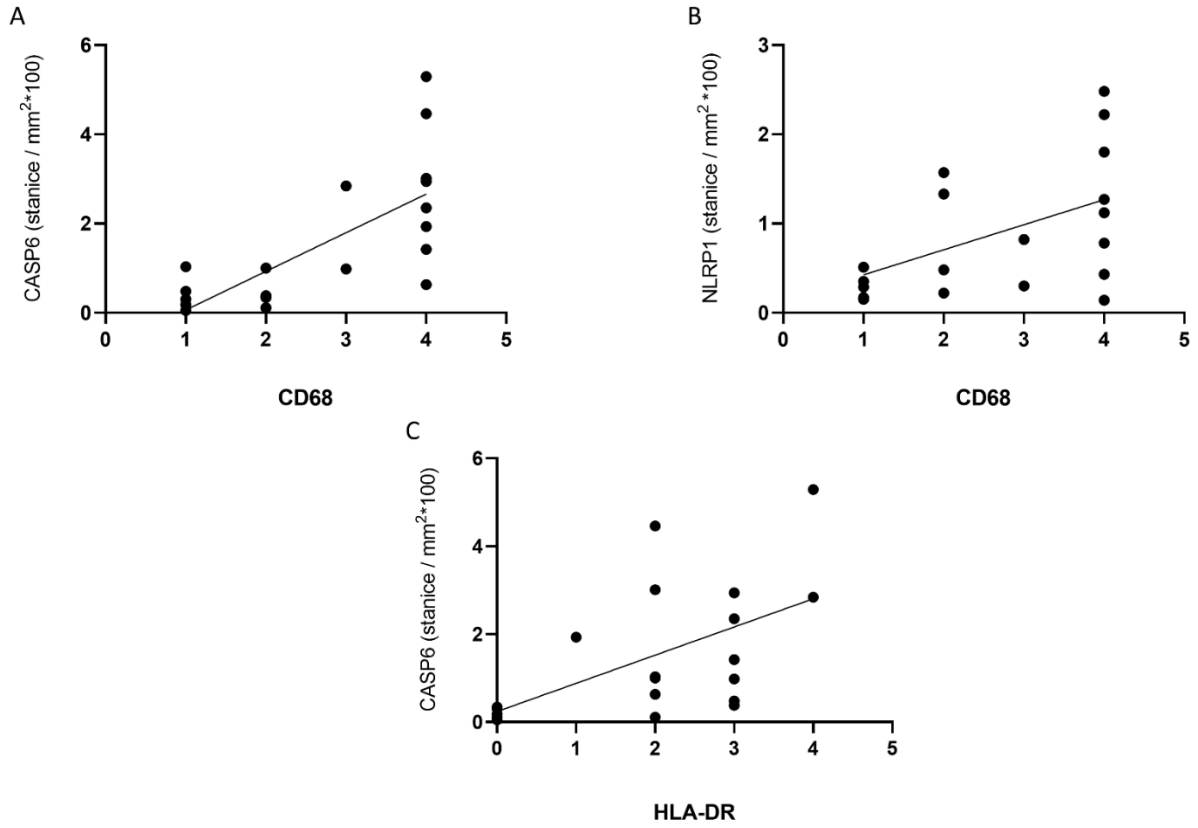
Slika 17. Prikaz korelacije Casp-6 i NLRP1 biljega u CA1 polju HF-a (r = 0,54; p = 0,01).

5.4. Korelacije biljega aktivacije mikroglije

Značajna pozitivna korelacija pronađena je između biljega CD68 i HLA-DR u dva polja HF-a: CA1 polju (R_S = 0,46; p = 0,04) i subikulu (R_S = 0,49; p = 0,03), dok je biljeg CD68 također pozitivno korelirao s IBA1 u CA2/3 (R_S = 0,55; p = 0,02). Analizirane su i korelacije biljega mikroglije s biljezima aktivacije inflamasoma. Tako je CD68 bio u visokoj i značajnoj pozitivnoj korelaciji s aktiviranom Casp-6 u CA1 polju (R_S = 0,76; p = 0,0001) i subikulu (R_S = 0,65; p = 0,0018), te kada se analizirala ukupna izraženost navedenih markera cijelog preparata (R_S = 0,66; p = 0,0016) (**Slika 14**). CD68 također je pozitivno korelirao s izraženosti ASC proteina u subikulu (R_S = 0,50; p = 0,03) te s NLRP1 u CA1 polju (R_S = 0,45; p = 0,04) i subikulu (R_S = 0,63; p = 0,003). Biljeg HLA-DR pozitivno je korelirao s aktiviranom Casp-6 u CA1 polju (R_S = 0,62; p = 0,003). Izraženost ASC proteina bila je u negativnoj korelaciji s IBA1 biljegom u hCA3 polju (R_S = - 0,46; p = 0,04). Izraženost NLRP1 bila je u pozitivnoj korelaciji s IBA1 u subikulu (R_S = 0,47; p = 0,04).



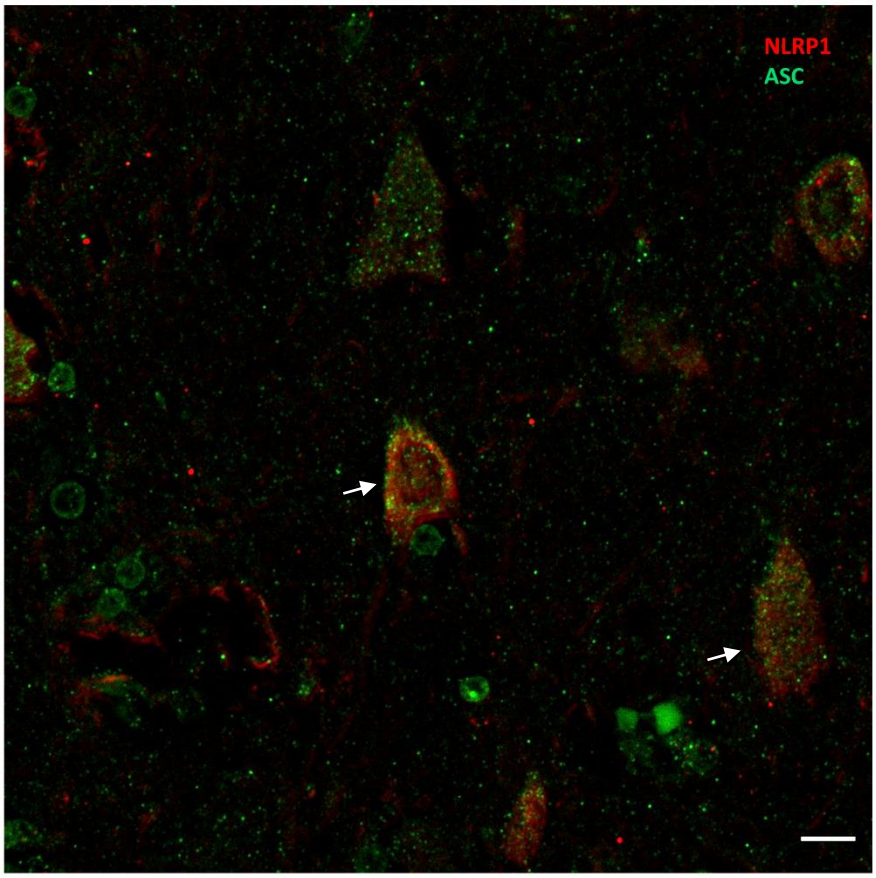
Slika 18. Prikaz korelacije izraženosti IBA1 biljega i NLRP1 inflamasoma (**A**; r = 0,47; p = 0,04), CD68 i ASC (**B**; r = 0,50; p = 0,03), CD68 i NLRP1 (**C**; r = 0,63; p = 0,003), CD68 i Casp-6 (**D**; r = 0,65; p = 0,0018) u subikulu.



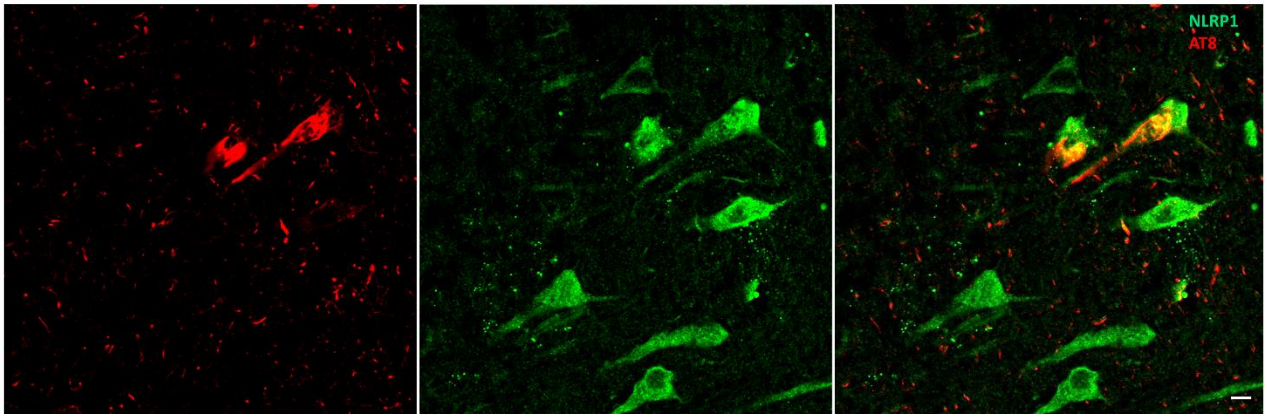
Slika 19. Korelacija CD68 biljega i Casp-6 (A; r = 0,76; p = 0,0001), CD68 i NLRP1 (B; r = 0,45; p = 0,04) te HLA-DR i Casp-6 (C; r = 0,62; p = 0,003) u CA1 polju.

5.5. Analiza kolokalizacije biljega metodom dvostrukog bojanja imunofluorescencijom

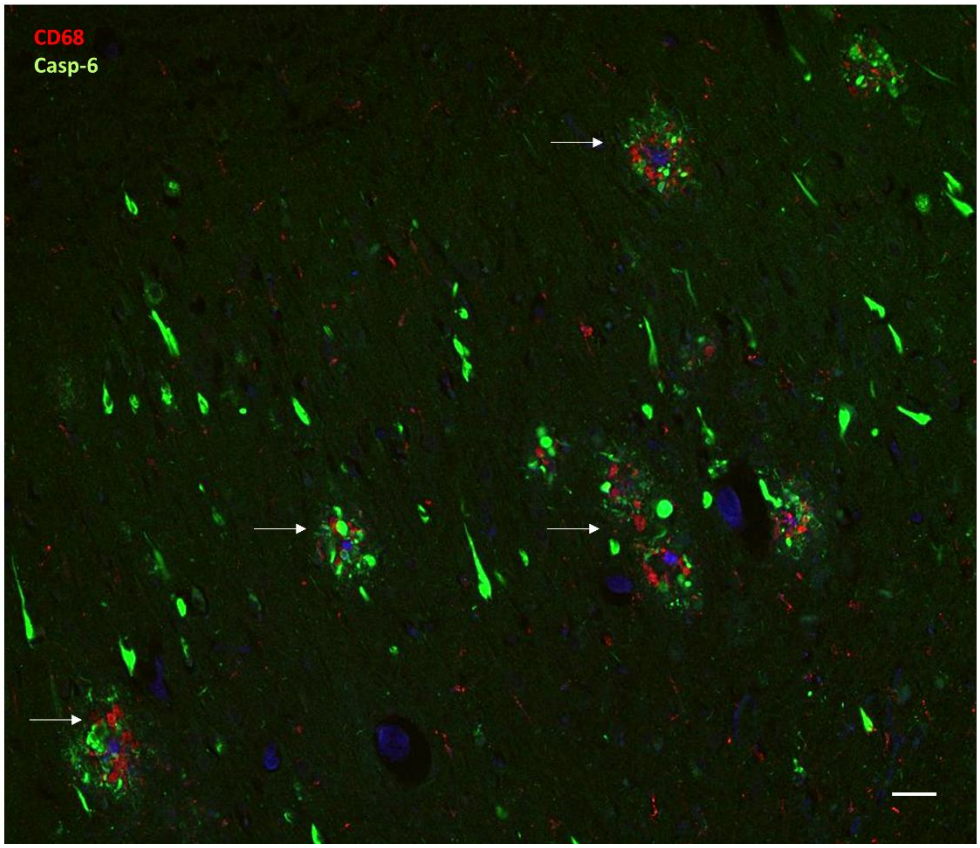
Napravljeno je dvostruko imunofluorescencijsko bojanje u sljedećim kombinacijama biljega: ASC i NLRP1, NLRP1 i AT8, Casp-6 i AT8, Casp-6 i CD68 te Casp-6 i HLA-DR. U nekim neuronima uočena je istovremena prisutnost NLRP1 i ASC proteina, no nije uočena imunoreaktivnost u nakupinama (**Slika 20**). U nekim neuronima imunoreaktivnim na AT8 protutijelo uočena je i izražena imunoreaktivnost na NLRP1 protein (**Slika 21**), kao i kolokalizacija AT8 i Casp-6 imunoreaktivnosti u neuronima te izvanstaničnim nakupinama (**Slika 25**). Dvostruko bojanje HLA-DR i CD68 biljega s Casp-6 pokazalo je da se markeri aktivne mikroglije (HLA-DR i CD68) nalaze u blizini aktivne Casp-6 u nakupinama (**Slike 22-24**).



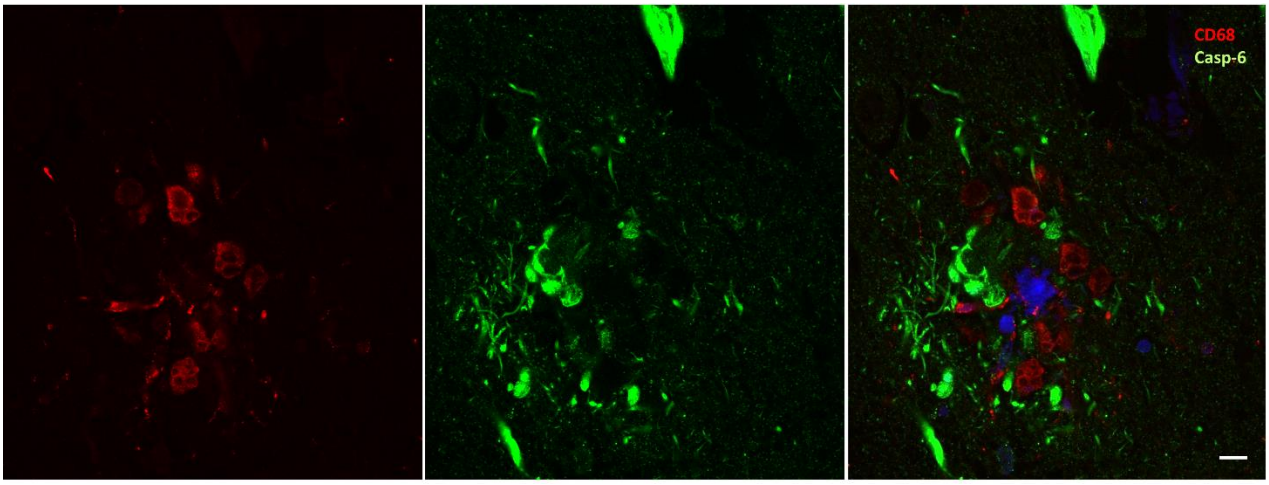
Slika 20. Izraženost NLRP1 i ASC proteina u CA1 polju HF-a u odabrano uzorku AD ispitanika. U nekim neuronima vidljiv je istovremeni izražaj oba proteina (bijele strelice). Mjerilo = 10 µm.



Slika 21. Kolokalizacija NLRP1 i AT8 imunoreaktivnosti u CA1 polju jednog AD ispitanika. U nekim neuronima u kojima su prisutne rane neuropatološke promjene karakteristične za neurofibrilarnu degeneraciju (AT8 imunoreaktivnost) vidljiv je i snažan izražaj NLRP1 proteina. Mjerilo = 10 µm.

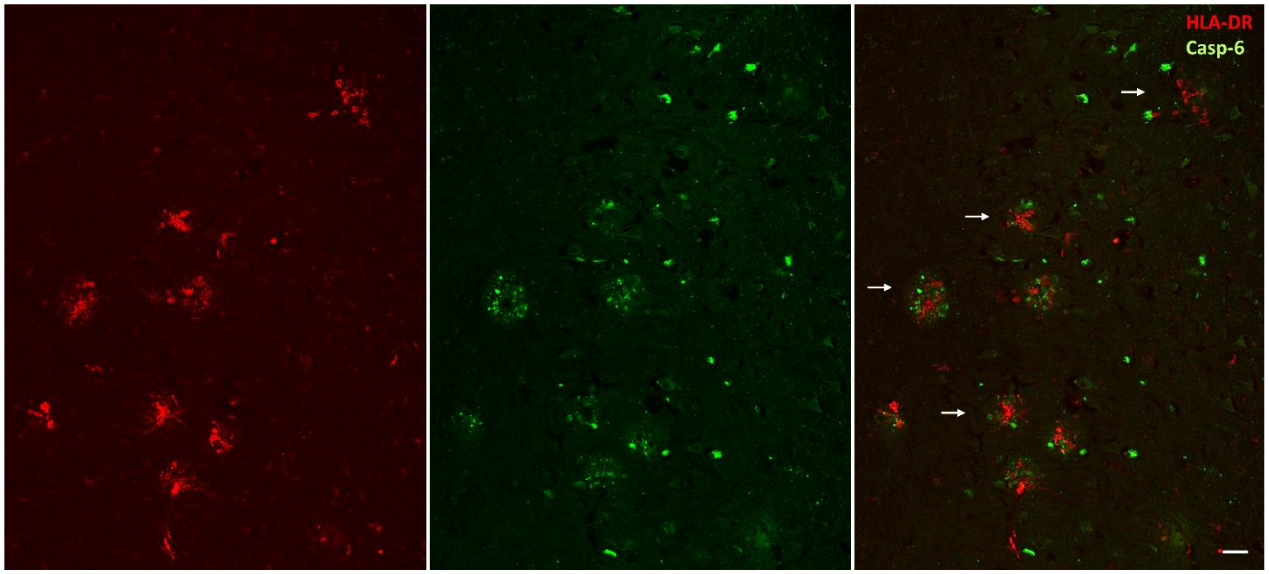


Slika 22. Istovremeni izražaj biljega CD68 i aktivirane kaspaze-6 u CA1 polju AD ispitanika. Biljeg aktivne mikroglije CD68 nalazi se u blizini aktivne Casp-6 u nakupinama u obliku grozdova u CA1 polju HF-a. Mjerilo = 50 µm.

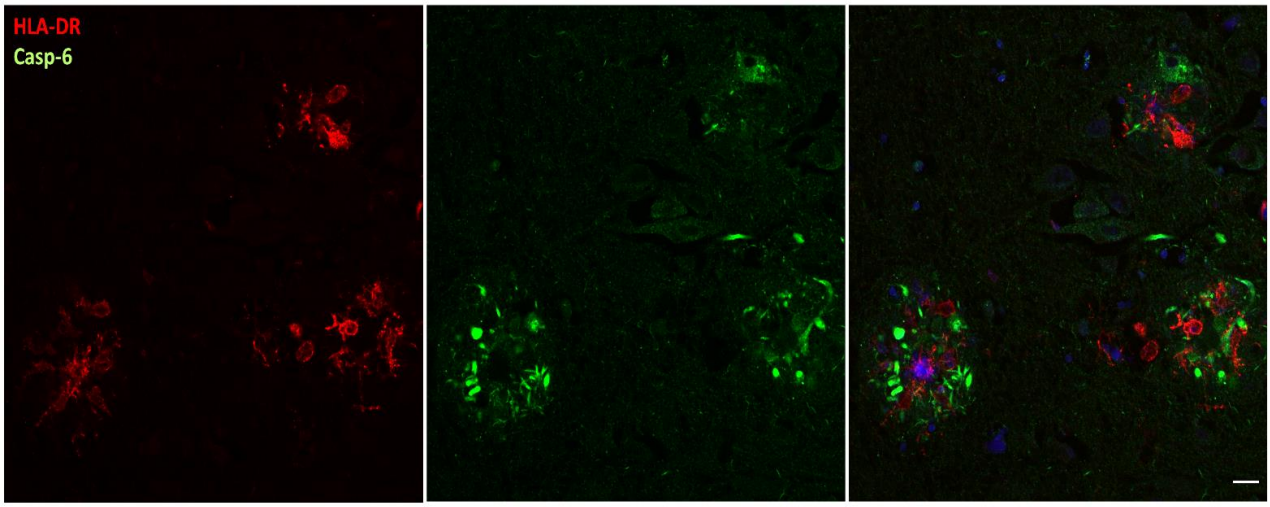


Slika 23. Istovremeni izražaj aktivirane kaspaze-6 i CD68. CD68 imunoreaktivnost je vidljiva u obliku nakupina poput grozda u CA1 polju HF-a AD ispitanika. Mjerilo = 10 µm.

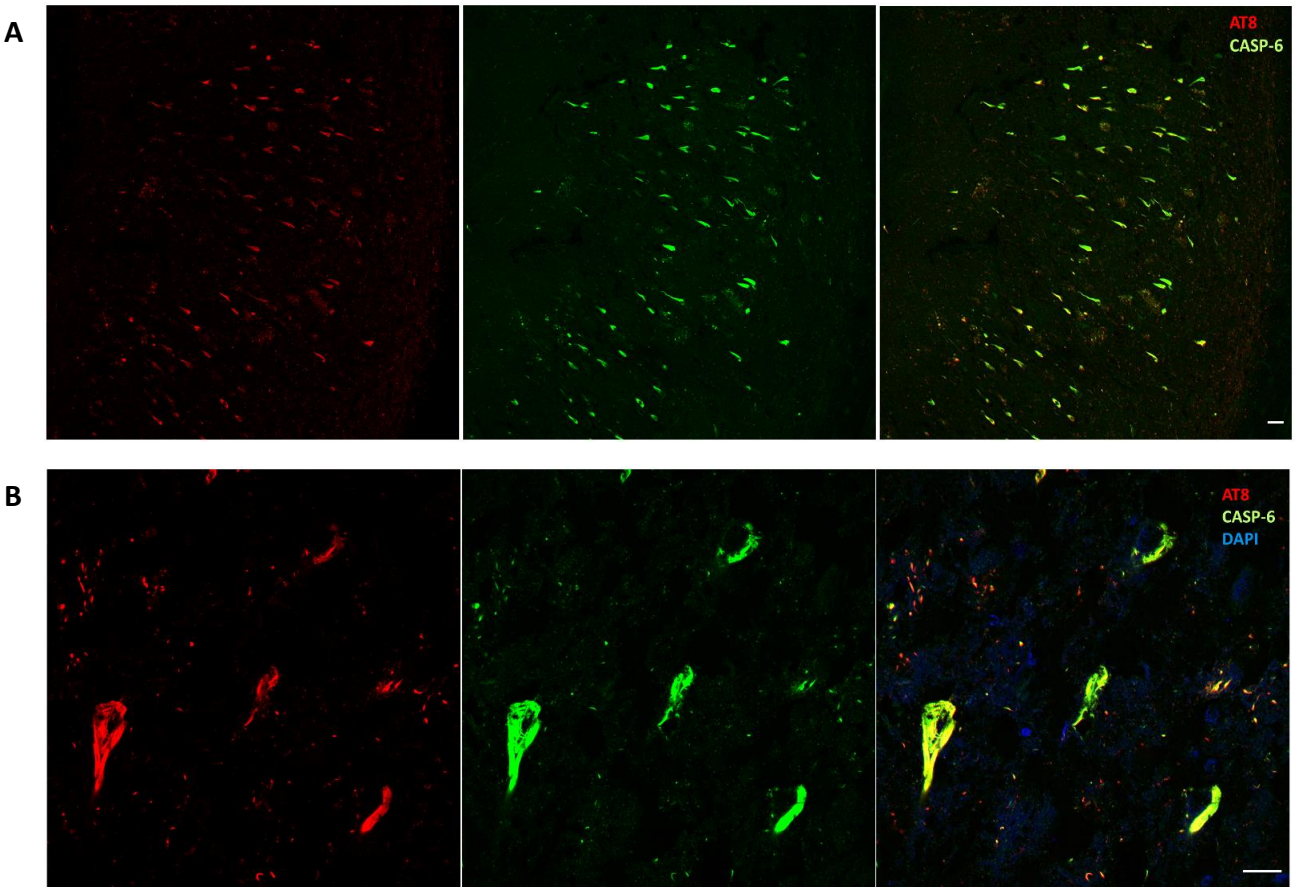
A



B



Slika 24. Istovremeni izražaj biljega HLA-DR i Casp-6 u AD ispitanika. Biljeg HLA-DR i Casp-6 zajedno su prisutni u nakupinama u **A**) CA2/3 polju; mjerilo 50 µm, **B**). Mjerilo = 20 µm



Slika 25. Kolokalizacija AT8 i aktivne Casp-6 u AD ispitanika. Snažna kolokalizacija aktivne Casp-6 i AT8 signala u **A**) CA2/3 polju HF, mjerilo 50 µm i **B**). Mjerilo = 20 µm.

5.6. Analiza koncentracija temeljnih biomarkera za Alzheimerovu bolest u likvoru

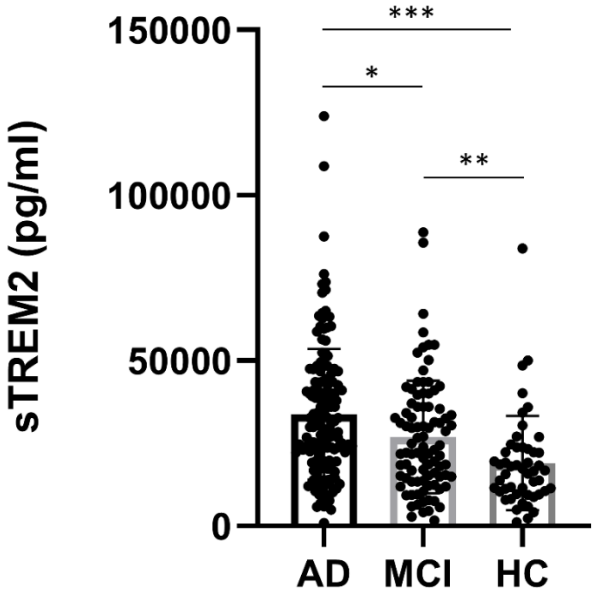
Koncentracije $A\beta_{1-42}$ u likvoru bile su najviše u MCI skupini te su se značajno razlikovale u odnosu na AD ($p = 0,05$) i kontrolnu skupinu ($p = 0,02$). Koncentracije $A\beta_{1-42}$ bile su najniže u AD skupini no razlike nisu dosegle statističku značajnost u odnosu na kontrolnu skupinu ($p = 0,83$).

Koncentracije ukupnog proteina tau (h-tau) u likvoru bile su značajno više u AD skupini u odnosu na MCI ($p < 0,0001$) i kontrolnu skupinu ($p < 0,0001$). Koncentracije su bile više i u MCI skupini u odnosu na kontrolnu, ali razlike nisu dosegle statističku značajnost ($p = 0,39$).

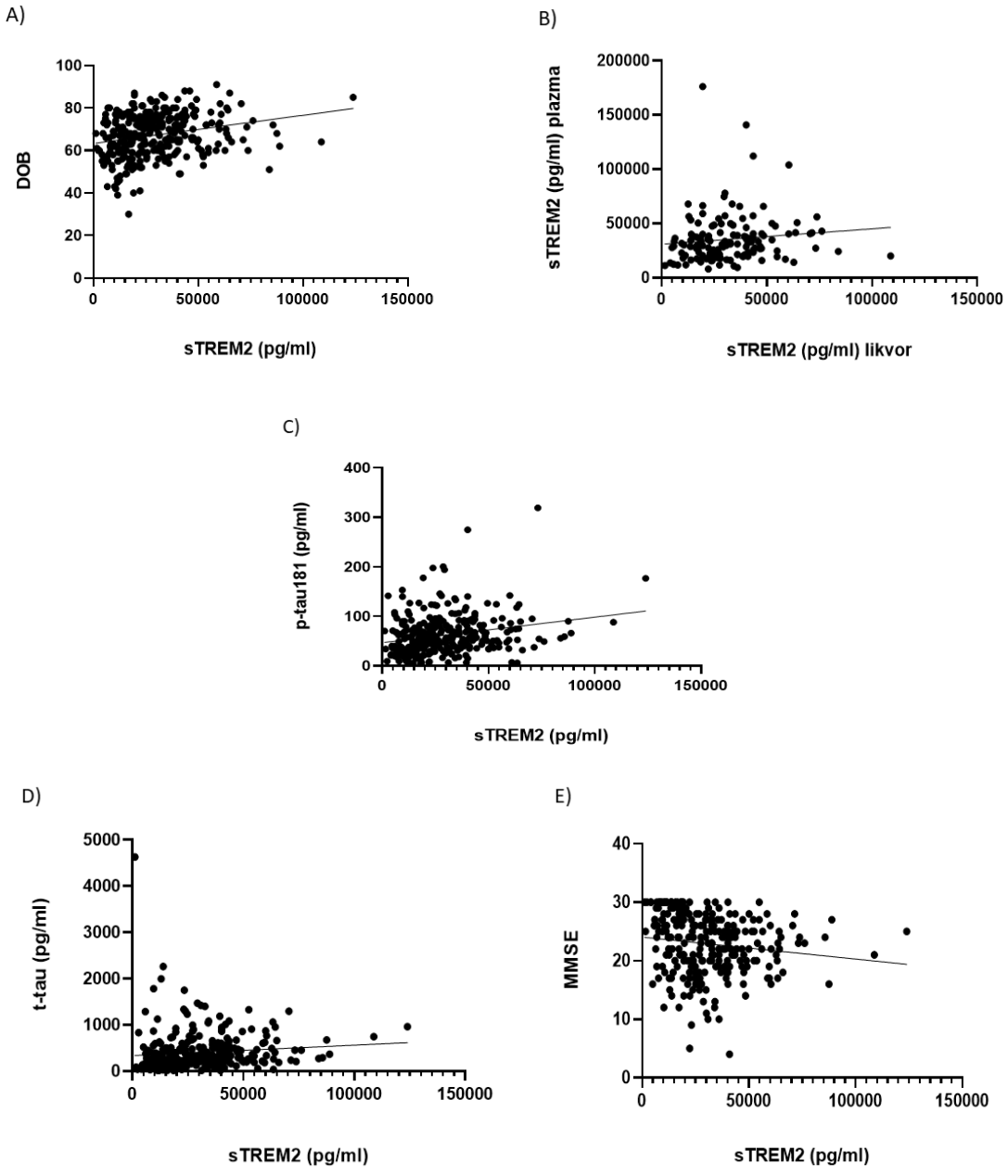
Koncentracije fosforiliranog protein tau (p-tau181) bile su značajno više u AD skupini u odnosu na MCI ($p < 0,0001$) i kontrolnu skupinu ($p < 0,0001$). Koncentracije su bile i značajno više u MCI u odnosu na kontrolnu skupinu ($p = 0,02$).

5.7. Analiza koncentracija sTREM2 u likvoru i plazmi

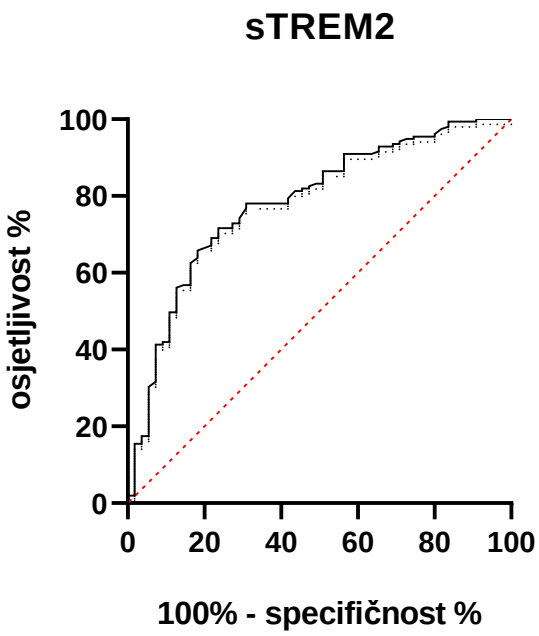
Koncentracije sTREM2 u likvoru bile su značajno više u AD skupini u odnosu na MCI ($p = 0,01$) i HC ($p < 0,0001$) skupine ispitanika, te u MCI skupini u odnosu na HC ($p = 0,01$) (**Slika 26**). Koncentracije sTREM2 u plazmi nisu se značajno razlikovale između skupina. Analizirane su i korelacije koncentracija sTREM2 u likvoru i plazmi s dobi ispitanika, brojem bodova MMSE ljestvice, koncentracijama ASC proteina te koncentracijama likvorskih biljega AD-a. Koncentracije sTREM2 u likvoru značajno su pozitivno korelirale s dobi ispitanika ($R_S = 0,27$, $p < 0,0001$), s koncentracijom sTREM2 u plazmi ($R_S = 0,20$, $p = 0,02$), koncentracijom ASC proteina ($R_S = 0,17$, $p = 0,004$), te koncentracijama p-tau$_{181}$ ($R_S = 0,26$, $p < 0,0001$) i t-tau proteina ($R_S = 0,30$, $p < 0,0001$). Negativno su korelirale s brojem bodova na MMSE ljestvici ($R_S = - 0.22$, $p = 0,0003$, **Slika 27**). Koncentracija sTREM2 u likvoru nije bila u korelaciji s koncentracijom Aβ_{1-42} ($R_S = 0,06$, $p = 0,30$). Koncentracija sTREM2 u plazmi, osim sa koncentracijom sTREM2 u likvoru, pozitivno je korelirale i s dobi ispitanika ($R_S = 0,26$, $p = 0,002$). Osjetljivost sTREM2 proteina kao biološkog biljega za AD bila je 71,61%, a specifičnost 76,36%, pri izlučnoj vrijednosti od 22344 pg/ml (AUC = 0,80; $p < 0,001$) (**Slika 28**).



Slika 26. Koncentracija sTREM2 u likvoru značajno je veća u skupini ispitanika s AD-om u odnosu na MCI ($p = 0,01$) i HC ($p < 0,0001$) skupine, te u skupini ispitanika s MCI-jem u odnosu na skupinu kontrolnih ispitanika ($p = 0,01$).



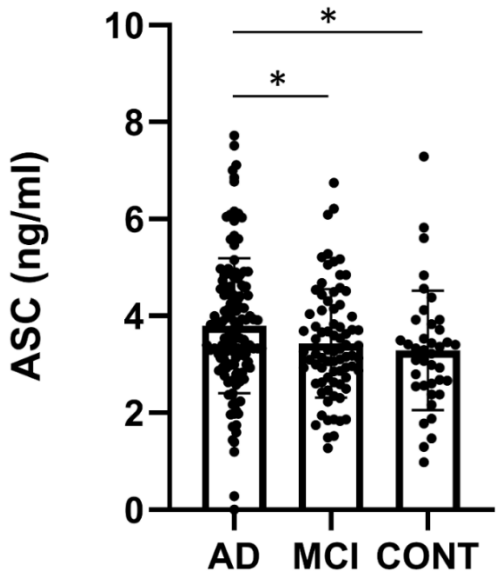
Slika 27. Koncentracija sTREM2 u likvoru u pozitivnoj je korelaciji s dobi ispitanika (r = 0,27, p < 0,0001) (**A**), koncentracijom sTREM2 u plazmi (r = 0,20, p = 0,02) (**B**), koncentracijom p-tau$_{181}$ (r = 0,26, p < 0,0001) (**C**) i t-tau proteinom (r = 0,30, p < 0,0001) (**D**). Koncentarcija sTREM2 u negativnoj je korelaciji s brojem bodova na MMSE ljestvici (r = - 0,22, p = 0,0003) (**E**).



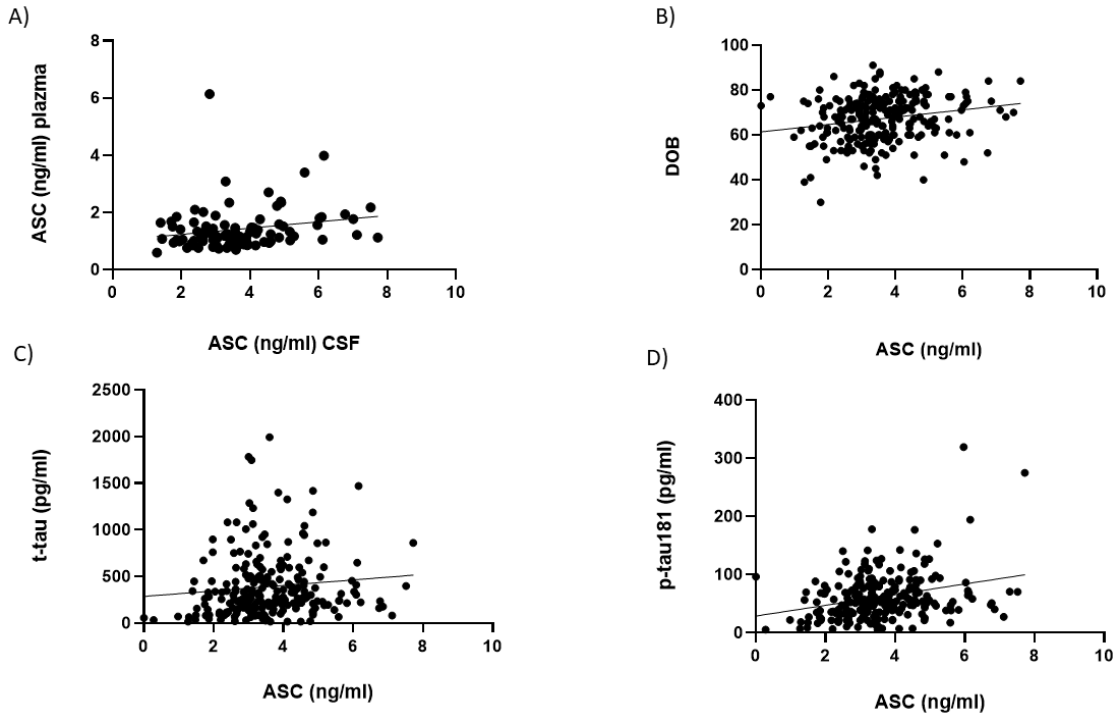
Slika 28. Krivulja osjetljivosti dijagnostičkog testa vrijednosti sTREM2 u likvoru (*Receiver Operating Characteristic*, ROC). AUC = 0,80; p < 0,0001

5.8. Analiza koncentracija ASC proteina u likvoru i plazmi

Koncentracije ASC proteina u likvoru bile su značajno veće u skupini AD ispitanika u odnosu na MCI (p = 0,04) i HC skupinu (p = 0,02, **Slika 29**), no nakon primjene *post hoc* Dunnovog testa značajnost se izgubila. Koncentracije ASC proteina u plazmi nisu se značajno razlikovale između skupina. Koncentracije ASC proteina u likvoru, osim s već spomenutom koncentracijom sTREM2 u likvoru, pozitivno su korelirale i s dobi ispitanika (R_S = 0,22, p = 0,0005), te koncentracijama p-tau$_{181}$ (R_S = 0,24, p = 0,0003) i t-tau proteina (R_S = 0,17, p = 0,01). Koncentracije ASC proteina u plazmi pozitivno su korelirale s koncentracijama ASC proteina u likvoru (R_S = 0,23, p = 0,02) i dobi ispitanika (R_S = 0,20, p = 0,02, **Slika 30**). Rezultati analize dijagnostičkog potencijala ASC proteina pokazali su da vrijednosti ASC proteina u likvoru nisu dobar pokazatelj razlika oboljelih od AD-a i zdravih ispitanika (AUC = 0,54; p = 0,42).



Slika 29. Koncentracije ASC proteina u likvoru značajno su veće u skupini AD ispitanika u odnosu na MCI (p = 0,04) i HC skupine (p = 0,02).



Slika 30. Korelacije koncentracije ASC proteina u likvoru s njegovom koncentracijom u plazmi (r = 0,23, p = 0,02) (**A**), dobi ispitanika (r = 0,22, p = 0,0005, **B**), te koncentracijama t-tau (r = 0,17, p = 0,01, C) i p-tau$_{181}$ (r = 0,24, p = 0,0003, **D**) proteina.

5.9. Analiza koncentracija citokina i kemokina u likvoru

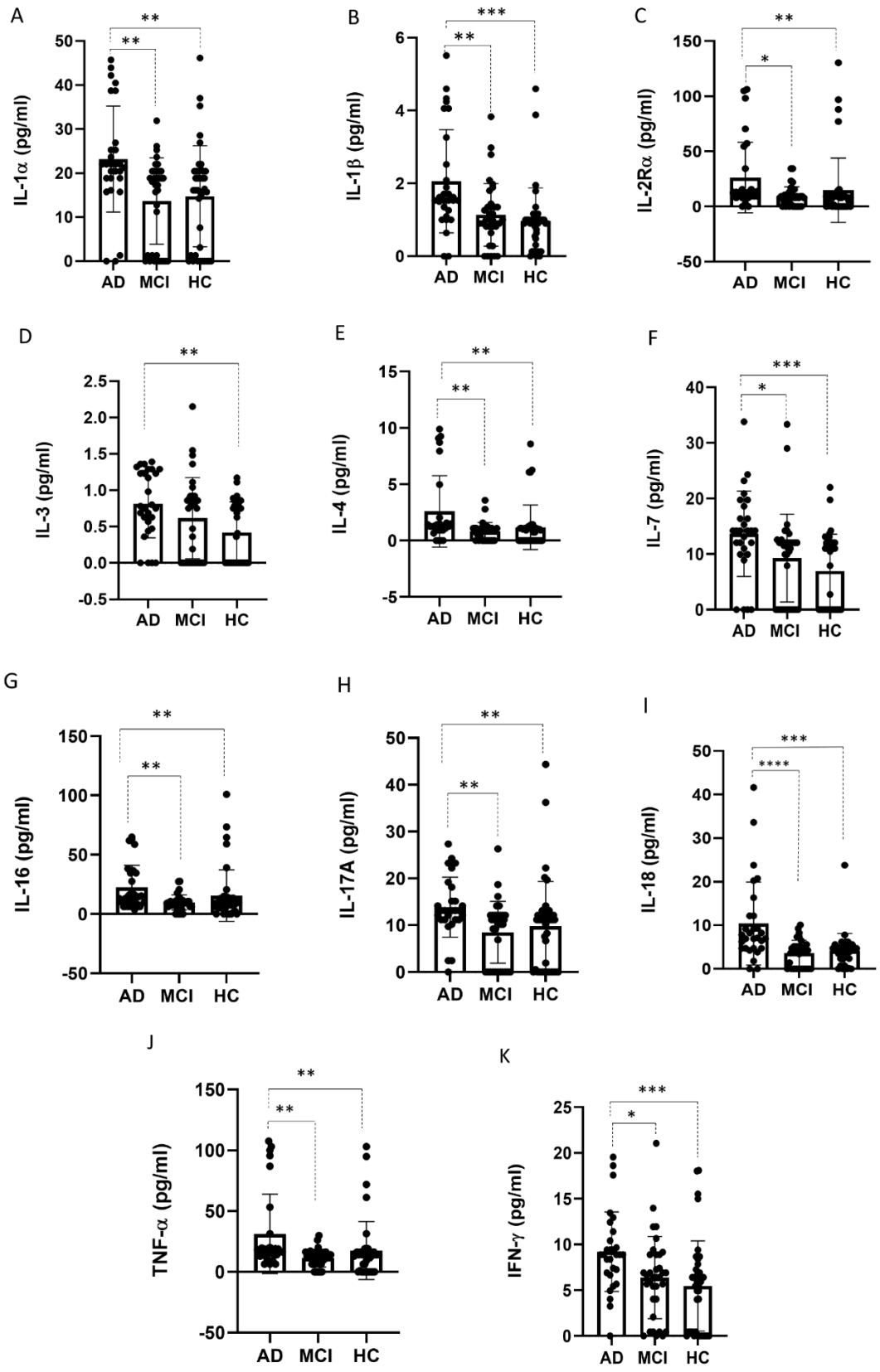
Analiza koncentracija citokina i kemokina u likvoru napravljena je na 29 AD, 35 MCI i 40 HC ispitanika. Od ukupno 48 analiziranih analita u likvoru je uspješno detektirano njih 35 (eotaxin, G-CSF, IFN-γ, IL-1β, IL-1α, IL-2Rα, IL-3, IL-16, IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, GRO-α, HGF, LIF, IL-10, IL-13, IL-17A, IP-10, MCP-1, MIG, SCF, SCGF-β, SDF-1α, MIP-1α, MIP-1β, RANTES, TNF-α, CTACK, MIF, TRAIL, IL-18, M-CSF i TNF-β). Od tih 35 analiziranih analita, koncentracije njih 15 značajno su se razlikovale između skupina (**Tablica 7, Slika 31** i **Slika 32**). Svi analiti čije su se koncentracije značajno razlikovale između skupina najveće su vrijednosti imali u skupini ispitanika s AD-om, osim kemokina IP-10 čije su koncentracije u skupini ispitanika s AD-om bile najniže, dok su mu najveće vrijednosti bile u skupini ispitanika s MCI-jem.

Tablica 6. Obilježja imunosnih medijatora detektiranih u likvoru ispitanika. Medijatori čije su koncentracije bile značajno veće u AD skupini označeni su zeleno. Crveno su označeni oni medijatori čije su koncentracije bile značajno veće u MCI skupini.

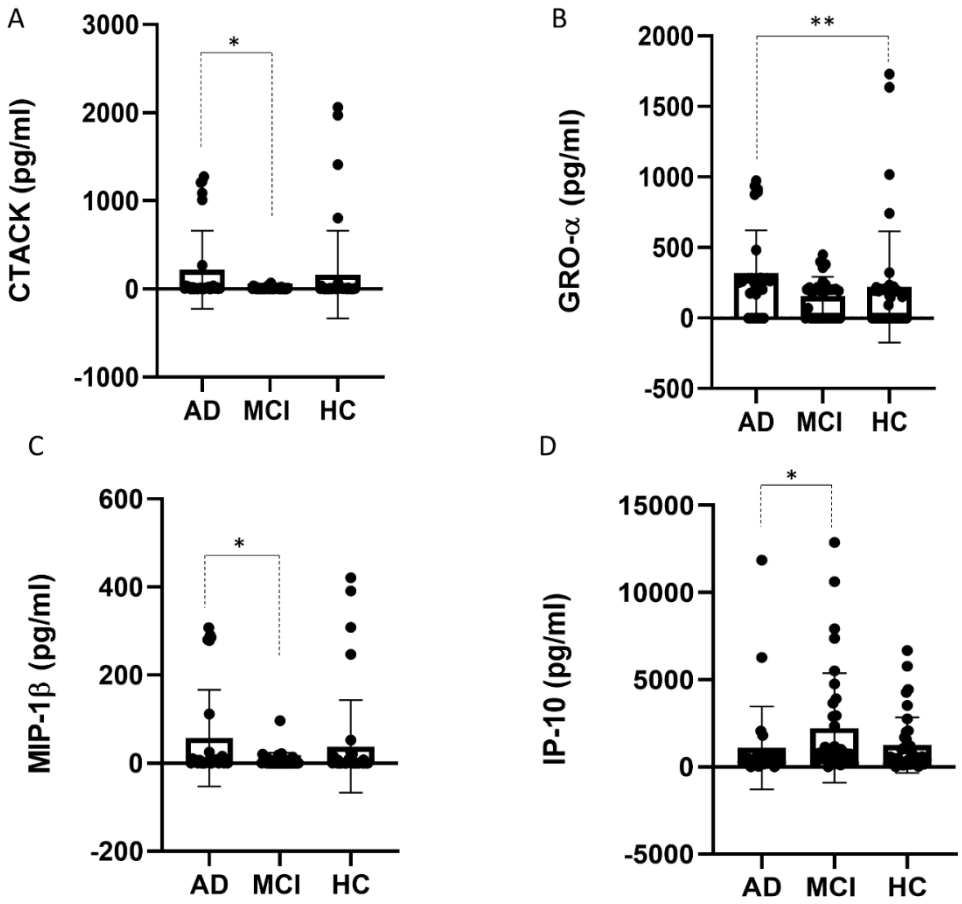
Skupina citokina	Medijator	Biološka uloga		Proupalni	Protuupalni	Imunopoticajni (potiču reakcije specifične imunosti)
Interleukini	IL-1β, IL-1α, IL-3, IL-4, IL-6, IL-7, IL-9, IL-10, IL-13, IL-16 IL-17A, IL-18	Uključeni u proliferaciju, diferencijaciju i diobu stanica; aktivacija ili utišavanje upalnog odgovora		IL-1α, IL-1β, IL-3, IL-6, IL-9, IL-17A, IL-18	IL-10, IL-13	IL-4, IL-7, IL-13, IL-18, IL-17A, IL-16
Interferoni (IFN)	IFN-γ IP-10	Imunomodulacija, antivirusni imunosni odgovor		IFN-γ, IP-10		IFN-γ, IP-10
Kemokini	GRO-α, MIP-1α, MIP-1β, CTACK, EOTAXIN, MCP-1, RANTES, MIG, SDF-1a, IL-8	Kemotaksija, angiogeneza, odgovor stečenog imunosnog sustava		IL-8, MCP-1, MIP-1β, RANTES, GRO-α, SDF-1a, CTACK, EOTAXIN, MIP-1α		
Čimbenici nekroze tumora	TNF-α, TNF-β	Proupalni odgovor, uključeni u procese apoptoze		TNF-α		
Čimbenici stimulacije kolonija (CSF)	G-CSF, GM-CSF, M-CSF	Proliferacija i diferencijacija pluripotentnih hematopoetskih matičnih stanica		G-CSF, GM-CSF, M-CSF		
Čimbenici rasta	Bazični FGF, PDGF-BB, VEGF, HGF, SCF, SCGF-b	Stimulacija staničnog rasta		PDGF-BB, SCF		
Drugi medijatori	LIF, MIF, TRAIL, IL-2Rα			MIF	TRAIL, LIF	IL-2Rα

Tablica 7. P vrijednosti analita čije su se koncentracije u likvoru razlikovale između skupina. Žuto su označene one koje su statistički značajne.

Analit	*p vrijednost*	
CTACK	0,03	AD vs. MCI
	0,11	AD vs. HC
	> 0,99	MCI vs. HC
GRO-α	0,05	AD vs. MCI
	0,01	AD vs. HC
	> 0,99	MCI vs. HC
MIP-1β	0,04	AD vs. MCI
	0,06	AD vs. HC
	> 0,99	MCI vs. HC
IP-10	0,04	AD vs. MCI
	0,57	AD vs. HC
	0,60	MCI vs. HC
TNF-α	0,001	AD vs. MCI
	0,01	AD vs. HC
	> 0,99	MCI vs. HC
IFN-γ	0,04	AD vs. MCI
	0,0004	AD vs. HC
	0,61	MCI vs. HC
IL-1α	0,004	AD vs. MCI
	0,004	AD vs. HC
	> 0,99	MCI vs. HC
IL-1β	0,003	AD vs. MCI
	< 0,0001	AD vs. HC
	0,83	MCI vs. HC
IL-2Rα	0,012	AD vs. MCI
	0,001	AD vs. HC
	> 0,99	MCI vs. HC
IL-3	0,59	AD vs. MCI
	0,01	AD vs. HC
	0,25	MCI vs. HC
IL-4	0,01	AD vs. MCI
	0,002	AD vs. HC
	> 0,99	MCI vs. HC
IL-7	0,02	AD vs. MCI
	0,0003	AD vs. HC
	0,76	MCI vs. HC
IL-16	0,004	AD vs. MCI
	0,01	AD vs. HC
	> 0,99	MCI vs. HC
IL-17A	0,002	AD vs. MCI
	0,01	AD vs. HC
	> 0,99	MCI vs. HC
IL-18	< 0,0001	AD vs MCI
	0,0003	AD vs HC
	> 0,99	MCI vs. HC



Slika 31. Koncentracije citokina čije su vrijednosti u likvoru najviše u AD skupini.



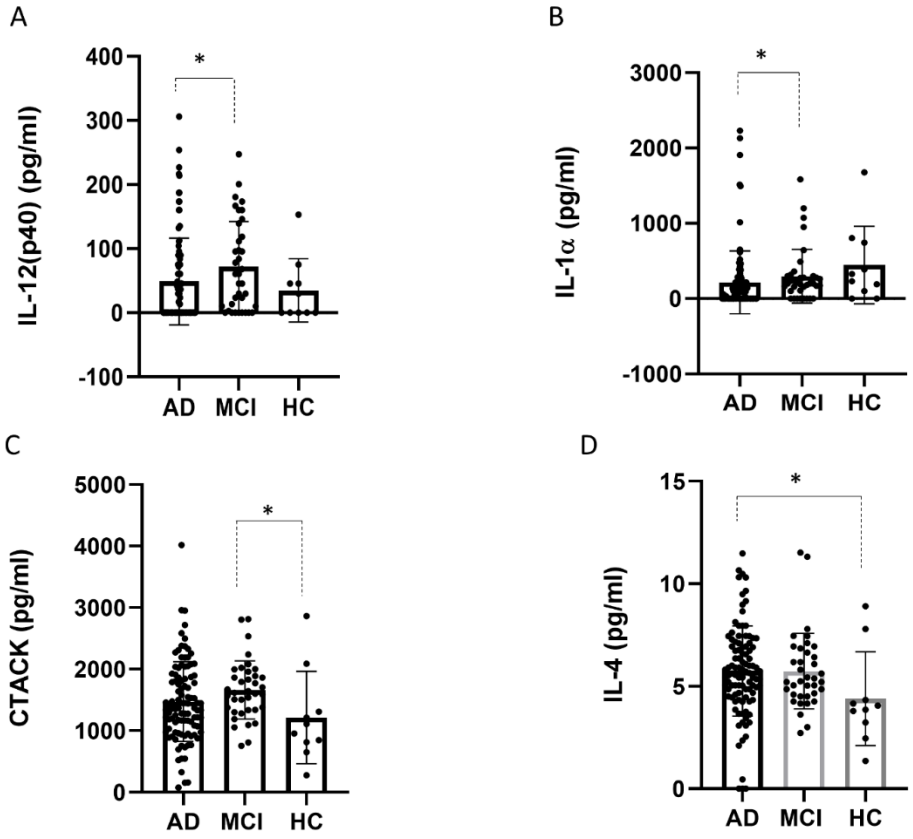
Slika 32. Koncentracije kemokina čije se vrijednosti značajno razlikuju između skupina. CTACK (**A**), GRO-α (**B**) i MIP-1β (**C**) najveće vrijednosti koncentracija imaju u AD skupini, dok su koncentracije IP-10 (**D**) u AD skupini najniže, a u MCI najviše.

5.10. Analiza koncentracija citokina i kemokina u plazmi

Koncentracije citokina i kemokina izmjerene su na 102 AD, 37 MCI i 10 HC uzorka plazme. Od svih 48 analiziranih analita jedino IL-3 nismo uspjeli detektirati u plazmi. Od svih detektiranih analita samo koncentracije njih 4 su se značajno razlikovale između grupa (**Tablica 8**, **Slika 33**). Vrijednosti koncentracija CTACK i IL-12 (p40) bile su najviše u MCI skupini, koncentracije IL-4 najviše su bile u AD a najviše vrijednosti koncentracija IL-1Rα zabilježene su u HC skupini.

Tablica 8. P vrijednosti medijatora čije su koncentracije u plazmi značajno različite između analiziranih skupina ispitanika.

Analit	*p vrijednost*	
CTACK	0,15	AD vs. MCI
	0,34	AD vs. HC
	0,03	MCI vs. HC
IL-12 (p40)	0,05	AD vs. MCI
	> 0,99	AD vs. HC
	0,27	MCI vs. HC
IL-4	> 0,99	AD vs. MCI
	0,05	AD vs. HC
	0,13	MCI vs. HC
IL-1Rα	0,02	AD vs. MCI
	0,11	AD vs. HC
	> 0,99	MCI vs. HC



Slika 33. vrijednosti koncentracija IL-12 (p40) (**A**), IL-1Rα (**B**), CTACK (**C**) i IL-4 (**D**) u plazmi.

5.11. Korelacije koncentracije citokina i kemokina u likvoru s ostalim ispitivanim biljezima, dobi i brojem bodova na MMSE ljestvici

Vrijednosti izmjerenih koncentracija citokini i kemokini detektiranih u likvoru korelirane su s ostalim analiziranim biljezima ($A\beta_{1-42,}$ h-tau, p-tau_{181}, TREM2 i ASC), kao i brojem bodova na MMSE ljestvici i dobi ispitanika. Značajne korelacije prikazane su u **Tablici 9**.

Tablica 9. Korelacija citokina i kemokina s ostalim analiziranim parametrima. Narančasto su označene negativne korelacije.

	TREM2	*Aβ42*	*p-tau181*	*MMSE*	*DOB*	*ASC*
HGF					* r = 0,22; p = 0,03	* r = - 0,21; p = 0,04
IFN-γ	** r = 0,27; p = 0,01		* r = 0,26; p = 0,02			
IL-1β		* r = 0,22; p = 0,04	** r = 0,29; p = 0,01	** r = - 0,36; p = 0,01	* r = 0,20; p = 0,05	
IL-7			* r = 0,22; p = 0,04	* r = - 0,27; p = 0,04		
CTACK				* r = - 0,31; p = 0,02		
GRO-α		* r = 0,23; p = 0,03				
IL-2Rα				*** r = - 0,43; p = 0,001		
IL-4	* r = 0,21; p = 0,05			** r = - 0,35; p = 0,01		
IL-16				* r = - 0,27; p = 0,04		
IL-18				* r = - 0,31; p = 0,02		
IL-3						* r = 0,24; p = 0,02
IL-6						* r = 0,26; p = 0,01
MCP-1		** r = - 0,33; p = 0,001				
M-CSF		*** r = - 0,36; p = 0,001				* r = - 0,26; p = 0,01
MIF		* r= -0.22; p= 0.04				
SCGF-b						** r = - 0,27; p = 0,01
MIG	* r = 0,24; p = 0,02			* r = - 0,27; p = 0,04	* r = 0,21; p = 0,04	* r = - 0,24; p = 0,02
EOTAXIN				** r = - 0,36; p = 0,01		* r = - 0,25; p = 0,02
IL-9	** r = 0,29; p = 0,01					
LIF	* r = 0,22; p = 0,03			* r = - 0,31; p = 0,02		* r = - 0,25; p = 0,01
MIP-1a	** r = 0,28; p = 0,01	* r = 0,26; p = 0,01		** r = - 0,38; p = 0,003		
MIP-1b	* r = 0,24; p = 0,02			* r = - 0,32; p = 0,02		
PDGF-bb	** r = 0,32; p = 0,001	** r = 0,31; p = 0,003				
TNF-b	** r = 0,31; p = 0,002			** r = - 0,34; p = 0,01		
TRIAL				** r = - 0,37; p = 0,005		* r = - 0,22; p = 0,03
G-CSF					* r = 0,23; p = 0,03	
IL-10		* r = - 0,24; p = 0,03				

6. RASPRAVA

6.1. Izražaj biljega mikroglija stanica u hipokampalnoj formaciji u kontrolnih, ispitanika s blagim spoznajnim poremećajem i ispitanika s Alzheimerovom bolesti

U uzorcima HF-a uz ponegdje nepravilne i stanice zadebljane some, IBA1 biljegom poglavito smo vidjeli bogato razgranate stanice. Za razliku od IBA1 signala, HLA-DR biljegom u AD skupini vidjeli smo više stanica nepravilnih oblika, zadebljane some te često u obliku nepravilnih nakupina snažnog intenziteta signala što upućuje na povećanu aktivnost stanica. CD68 bio je vidljiv kao difuzni točkasti signal ili u obliku nakupina, uglavnom u AD ispitanika što je pokazatelj veće aktivnosti mikroglije u AD skupini. Temeljem uočenih obrazaca imunoreaktivnosti tih biljega zaključeno je da IBA1 biljeg prikazuje mikrogliju u mirovanju i početnoj fazi aktivacije, a tek rijetko aktivnu mikrogliju u nakupinama. Suprotno tome, HLA-DR i CD68 biljegom često se može uočiti, posebice u AD ispitanika, imunoreaktivnost u nakupinama koje ukazuju na jače aktivnu mikrogliju. Nedostatak značajne razlike u izraženosti IBA1 biljega između skupina pokazuje da je mikroglija koju je ovim biljegom moguće detektirati podjednako prisutna u AD-u i u kognitivno zdravih starih ljudi. Značajno veći izražaj HLA-DR biljega u CA1 polju u AD ispitanika te CD68 u svim poljima HF-a u AD skupini pokazuje da je prisutnost jače aktivirane mikroglije ipak veća u mozgu oboljelih od AD-a što je dodatna potvrda opažanja i ranijih sličnih studija (45,72,143). Posebno je zanimljiva zabilježena distribucija jačine signala po različitim poljima HF-a. Biljezi koji su vizualizirali jače reaktivnu mikrogliju (HLA-DR i CD68) u AD-u su najjači izražaj imali u CA1 polju, a najmanji u CA2/3. Nasuprot tome, u CA1 polju HC skupine oba biljega imala su najslabiji izražaj. Izraženost oba biljega međusobno pozitivno korelira u CA1 polju i subikulu. Suprotno tome, IBA1 biljeg u AD skupini najviše vrijednosti je imao u CA2/3 polju, a jedina njegova pozitivna korelacija zabilježena je s biljegom CD68 u CA2/3 što bi značilo da je u CA2/3 polju više neaktivne i mikroglije u početnoj fazi aktivacije. Poznato je da je CA1 polje u AD-u najjače zahvaćeno patološkim promjenama tau proteina (144–147), dok je CA2 polje najotpornije na neurofibrilarne promjene u AD-u, kao i tijekom normalnog starenja (148,149). Već je ranije višestruko dokumentirano da su neurofibrilarne promjene i aktivacija mikroglije usko povezani događaji u tijeku AD-a, te da promijenjeni oblici tau proteina aktiviraju mikrogliju (46,47,58,150). Također, stanje pojačane upale može poticati neurofibrilarne promjene (63,64,151). Naša zapažanja ukazuju da su različiti stupnjevi aktivacije mikroglije i pojava neurofibrilarne

degeneracije u različitim dijelovama HF-a visoko međuovisni procesi, a neke od mogućih mehanizama koji ih posreduju raspravit ćemo kasnije u kontekstu aktivacije inflamasoma.

6.2. Izražaj biljega aktivacije NLRP1 inflamasoma

NLRP1 inflamasom u CNS-u je naročito prisutan u piramidnim neuronima i oligodendrogliji (120), a neke varijante NLRP1 gena povezane su s povećanim rizikom za obolijevanje od AD-a (103). Stoga sve više raste interes za istraživanje uloge aktivacije NLRP1 inflamasoma u AD-u. Rezultati ovog istraživanja pokazuju da su i NLRP1 i ASC protein značajno jače izraženi u HF-u AD skupine ispitanika što je pokazatelj jače aktivacije NLRP1 inflamasoma u AD-u. Još uvijek nije poznat razlog jače aktivacije NLRP1 u AD-u a neke od pretpostavki su da uzrok tomu može biti stanični stres koji se javlja uslijed nastajanja patoloških promjena u AD-u – Aβ (uključujući i unutarstanični Aβ i metabolite APP-a) i patoloških oligomera tau proteina (106,122), predispozicija za snažniju aktivaciju uzrokovana određenim varijantama NLRP1 gena (103), prethodna aktivacija NLRP3 inflamasoma u mikrogliji sa širenjem putem ASC proteina („specks“) (108) ili pak sinergističko djelovanje više spomenutih mogućih uzroka. Nedavno istraživanje pokazalo je da virusne proteaze mogu cijepati NLRP1 i na taj način poticati njegovu aktivaciju (152). Studija procjene broja NFT-a na susjednim uzorcima pokazala je da ukupan izražaj NLRP1 proteina pozitivno korelira s brojem NFT-a (147), što ukazuje na moguću povezanost pojave neurofibrilarnih promjena i aktivacije NLRP1 inflamasoma. Pozitivna korelacija ukupnog izražaja NLRP1 i ASC-a potvrđuje njihovu zajedničku uključenost u proces aktivacije NLRP1 inflamasoma u analiziranim uzorcima. In vitro studije i studije na animalnim modelima također potvrđuju povećanu ekspresiju NLRP1 u mozgu i stanicama s patološkim obilježjima AD-a (106,122,153). Slično je zabilježeno i u mozgu čovjeka; naime, u SUB-u ispitanika s AD-om puno je više NLRP1 imunoreaktivnih neurona u usporedbi s kontrolnim uzorcima, a razine mRNA NLRP1 također su veće nego u kontrola (122). Kada je u ovom istraživanju uspoređena imunoreaktivnost NLRP1 i ASC proteina, dalo se zamjetiti da NLRP1 ipak ima snažniji izražaj. Razlog tome mogli bi biti različiti putevi aktivacije NLRP1 inflamasoma. Naime, NLRP1 može vezati CASP-1 direktno ili preko stvaranja kompleksa s ASC proteinom što dodatno pojačava i umnaža aktivaciju CASP-1 (154). To znači da ne mora svaki aktivirani NLRP1 inflamasom sadržavati ASC protein, čime bi se moglo objasniti uočene razlike u izražaju tih dvaju proteina.

Nadalje, u analiziranim uzorcima je cGSDMD protein imao najslabiju izraženost od svih analiziranih biljega te nije pokazivao značajne razlike između skupina AD, MCI i HC ispitanika, što bi se moglo protumačiti da je cijepanje GSDMD proteina u neuronima HF-a vjerojatnija posljedica starenja nego patoloških promjena u AD-u. Moguće je također da u AD-u kaspaza-1 ima veći afinitet za cijepanje kaspaze-6 što posljedično dovodi do slabijih interakcija s GSDMD-om. GSDMD je umjereno eksprimiran u mozgu čovjeka (155), pa bi svaka pojačana izraženost mogla ukazivati na odmak od stanja homeostaze. Iako je GDSMD ključni posrednik piroptoze, svako formiranje GSDMD pora na membranama stanice ne mora nužno značiti da će se ona i dogoditi (155,156). Neuroni su trajno diferencirane stanice dugog životnog vijeka te je poznato da starenjem prolaze spor proces degenerativnih promjena. Iz tog razloga malo je vjerojatno da se u neuronima odvija proces piroptoze (155,157–160). Jedno nedavno istraživanje pokazalo je prisutnost mehanizma za oporavak membrane tijekom procesa piroptoze u makrofagima (156), što dodatno ide u prilog navedenom tumačenju. Rezultati dobiveni u ovom istraživanju razlikuju se od ranije objavljenih zapaženja povećane ekspresije GSDMD-a u AD-u i animalnim modelima AD-a (106,161,162). Nedostatak tih studija jest što one nisu istraživale cijepanje GSDMD-a u mozgu. Također, iako je piroptoza dokazana u tkivu mozga, većina spomenutih istraživanja rađena je *in vitro* ili indirektno mjerenjem oslobađanja upalnih i piroptotskih signala (106,155,163), što nije dostatno za dokazivanje procesa piroptoze u određenom tipu stanica ili dijelu mozga. Stoga je potrebno napraviti dodatna istraživanja na uzorcima tkiva mozga čovjeka. Ipak, iako ne može biti dovoljan za potvrdu piroptoze, signal cGSDMD-a u neuronima može značiti pojavu nekih drugih fizioloških ili patofizioloških promjena (155). Zasigurno, to može biti pokazatelj pojačanog lučenja proupalnih medijatora, budući da se uslijed aktivacije inflamasoma kroz GSDMD pore otpuštaju aktivni oblici citokina IL-1β i IL-18 (164). Povećane koncentracije proupalnih citokina mogu pak utjecati na pojavu ili napredovanje patoloških promjena tau proteina (64). Prisutnost cGSDMD proteina u analiziranim uzorcima u ovom istraživanju pozitivno je korelirala s izraženosti ASC proteina i kaspaze-6, što je potvrda njegove uključenosti u proces aktivacije inflamasoma u neuronima. Zaključno, ulogu cGSDMD-a te njegov utjecaj na oslobađanje citokina i iniciranja piroptoze u neuronima potrebno je dodatno istražiti u tkivu mozga čovjeka.

Od svih analiziranih biljega, imunoreaktivnost aktivirane CASP-6 bila je najjača. Izražaj CASP-6 značajno je bio veći u AD skupini što je pokazano i ranije u tkivu mozga čovjeka (122,158, 165–169). U analiziranim uzorcima uočena je izražena imunoreaktivnost na aktiviranu kaspazu-6,

napose u tijelima velikih piramidnih neurona HF-a. Slično kao i GSDMD, izraženost CASP-6 u mozgu čovjeka je u normalnim okolnostima niska, stoga i najmanje povećanje ekspresije ukazuje na odmak od homeostatskog stanja (170). U uzrocima analiziranim u ovom istraživanju ukupan je izražaj CASP-6 pozitivno korelirao s NLRP1 i cGSDMD proteinima, a u CA2/3 polju je uz NLRP1 i cGSDMD izraženost CASP-6 bila u pozitivnoj korelaciji i s ASC proteinom. Spomenute pozitivne korelacije u skladu su s objavljenim istraživanjem da se aktivacija CASP-6 događa uslijed aktivacije inflamasoma u neuronima (122). Izražaj svih testiranih biljega bio je najjači u CA2/3 polju, a CASP-6 je osim u CA2/3 bila snažno izražena još i u CA1 polju HF-a. CA1 je dio hipokampusa za koji je poznato da je najjače zahvaćen neurofibrilarnim promjenama (144–147) pa bi se moglo pretpostaviti da bi, s obzirom na slabiju ekspresiju NLRP1, ASC i cGSDMD u CA1 polju u usporedbi s izražajem CASP-6, procesi koji uključuju aktivaciju tih proteina mogli biti značajno aktivniji u ranom stadiju nastajanja patoloških procesa unutar neurona s početnim neurofibrilarnim promjenama. Za razliku od njih, CASP-6 bi mogla biti dulje aktivna i prisutna također i u kasnijim stadijima AD-a te u neuronima s već formiranim NFT-ovima. Izražena ekspresija CASP-6 u CA1 polju također je potvrda ranijih spoznaja da povećana aktivnost CASP-6 u CA1 neuronima tijekom starenja korelira sa slabijim kognitivnim statusom (171).

6.3. Usporedba izražaja biljega aktivacije inflamasoma s dobi i spolom ispitanika

Iako je raspon godina analiziranih uzoraka bio od 59 do 91 godine starosti, nijedan od ispitivanih biljega nije korelirao s dobi ispitanika što bi značilo da razlike u aktivaciji inflamasoma povezane sa samim procesom starenja (*per se*) nisu uočene. Jedno nedavno istraživanje na animalnom modelu pokazalo je, suprotno našim rezultatima, da je aktivacija NLRP1 inflamasoma usko povezana s promjenama koje se događaju tijekom starenja (172). Također, ranije je pokazano da je aktivacija NLRP1 inflamasoma izraženija u mozgu ženki APP/PS1+/- miševa, dok naši rezultati nisu pokazali spolne razlike u izražaju nijednog ispitivanog biljega. Razlozi dobivanja navedenih oprečnih rezultata mogu se tražiti u relativno malom broju uzoraka analiziranih u našem istraživanju, ali mogu ležati i u vjerojatnim razlikama u procesima aktivacije NLRP1 inflamasoma u različitim ispitivanim vrstama. Također, može se zaključiti da je stanje u mozgu starijih osoba koje ne pokazuju patološke promjene AD-a, neuropatološki slično (144), pa značajnije promjene izazvane starenjem mogu biti uočene tek ukoliko se uključe i mlađe dobne skupine (173).

6.4. Odnos aktivacije inflamasoma i mikroglije i neurofibrilarnih promjena

Još uvijek je nejasno je li aktivacija inflamasoma u AD-u uzrok ili posljedica patoloških procesa. CA2/3 polje je u ovom istraživanju konzistentno pokazivalo najveću imunoreaktivnost svih analiziranih biljega i u AD i HC skupini uzoraka. Jedno prijašnje istraživanje na susjednim rezovima tkiva pokazalo je da su neuroni CA2/3 polja uglavnom pošteđeni neurofibrilarnih promjena te da imaju visoku imunoreaktivnost neuronalne (konstitutivne) sintetaze dušikovog oksida (nNOS) (148). Ta spoznaja, zajedno s rezultatima ovog istraživanja ukazuje da bi veća proizvodnja dušikovog oksida (NO) i aktivacija NLRP inflamasoma mogli biti usko povezani procesi. Stoga razina ekspresije NO sintetaze može utjecati na aktivaciju inflamasoma posredovanu lučenjem NO. Kako aktivacija NLRP1 inflamasoma može pogoršati ili uzrokovati patološke promjene u AD-u (106,122), navedeni rezultati upućuju na to da bi neuroni CA2/3 polja mogli biti otporniji na neurofibrilarne promjene uzrokovane aktivacijom NLRP1 inflamasoma. Razlog jače otpornosti CA2/3 neurona mogle bi biti razlike u interakcijama između mikroglije i neurona te krvnih žila u tom području (174–176). Poznato je da snažna aktivacija NLRP3 inflamasoma može utjecati na fosforilaciju, agregaciju i širenje tau proteina (10,108,177) a neke su studije pokazale kako NO može potisnuti aktivaciju NLRP3 inflamasoma (178,179). NLRP3 inflamasom u CNS-u je pretežno eksprimiran u mikrogliji, a ako je zbog veće koncentracije NO u CA2/3 području njegova aktivacija suprimirana, mikroglija stanice u CA2/3 polju mogle bi umjesto proupalnog, eksprimirati protuupalni protektivni fenotip. Istraživanje mozga u ishemiji pokazalo je da je broj aktiviranih mikroglija stanica i astrocita oko oštećenih neurona veći u CA2/3 nego u CA1 polju, pa se pretpostavlja da bolja učinkovitost uklanjanja oštećenih dijelova neurona djeluje neuroprotektivno (180). Nadalje, u usporedbi s CA1, neuroni CA2/3 polja jače reagiraju na učinke neurotrofičnih čimbenika koje luči glija (174). Zanimljivo, već spomenuti rezultati našeg istraživanja pokazuju da je izražaj IBA1 biljega najjači u CA2/3, a IBA1 imunoreaktivna mikroglija u analiziranim uzorcima jasno se može okarakterizirati kao mikrogliju u ranijem stadiju aktivacije, što bi mogla biti dodatna potvrda spomenutih pretpostavki. Među detektiranim korelacijama biljega aktivacije mikroglije i inflamasoma, važno je istaknuti da je izražaj NLRP1 bio u pozitivnoj korelaciji s biljegom CD68 u SUB-u i CA1, a izražaj aktivirane CASP-6 s CD68 i HLA-DR u CA1 polju te s CD68 u SUB-u i kada se gledao ukupan izražaj na razini preparata. Takav odnos izraženosti biljega govori nam da jača aktivacija mikroglije može poticati jaču aktivaciju NLRP1 inflamasoma u tim područjima te posljedično ubrzati neurofibrilarne promjene.

Već spomenuti nalaz da ukupni izražaj NLRP1 proteina pozitivno korelira s ukupnim brojem NFT-a po uzorku (147) dodatno potvrđuje da je aktivacija NLRP1 inflamasoma vjerojatno usko povezana s pojavom patoloških promjena tau proteina. Ta hipoteza predložena je i ranije kada je pokazano da su NLRP1 i tau pocijepan djelovanjem CASP-6 (TauΔCasp6) prisutni u istim neuronima (122). Sveukupno, rezultati ovog istraživanja idu u prilog pretpostavki da je upala jedan od primarnih, a možda i ključni uzrok neuropatoloških promjena u AD-u, no precizan slijed događaja i uloga aktivacije inflamasoma tijekom nastanka i progresije bolesti tek će trebati do kraja biti razjašnjeni. Također, potrebno je dodatno istražiti interakcije i međuovisnost aktivacije mikroglijalnih (NLRP3) i neuronalnih (NLRP1) inflamasoma.

6.5. Analiza kolokalizacije biljega metodom imunofluorescencije

U analiziranim uzorcima izražaj biljega aktivacije inflamasoma u pojedinim neuronima pokazao je istovremenu prisutnost i ASC i NLRP1 proteina, no u nekim neuronima to nije bio slučaj. Naime, neki neuroni koji pokazuju neurofibrilarne promjene (AT8 imunoreaktivnost) pokazivali su snažan izražaj NLRP1 proteina. Detaljna analiza nije napravljena na svim dostupnim uzorcima te bi svakako trebalo dodatno ispitati i spomenute interakcije. Najznačajniji rezultati dobiveni ovom analizom su snažna i gotovo stopostotna kolokalizacija aktivne CASP-6 i AT8 signala u neuronima, ali i izvanstaničnim nakupinama. Takav nalaz potvrdio je ranije objavljene rezultate o interakcijama CASP-6 i tau proteina (122,169) te dodatno naglasio potencijalnu ulogu aktivacije NLRP1 inflamasoma u nastajanju neurofibrilarnih promjena u tkivu mozga čovjeka. Dvostruko bojanje HLA-DR i CD68 markera s CASP-6 pokazalo je da se aktivna mikroglija nalazi u izvanstaničnim nakupinama zajedno s aktivnom CASP-6, što je također potvrda pretpostavke o međuovisnosti aktivacije mikroglije i NLRP1 inflamasoma.

6.6. Vrijednosti koncentracija TREM2 u likvoru i plazmi

TREM2 je receptor na staničnoj membrani mikroglije uključen u regulaciju broja mijeloidnih stanica, interakciju s apolipoproteinima, Aβ-om, fagocitozu i upalni odgovor, a poznato je da neke varijante TREM2 gena povećavaju relativni rizik za obolijevanje od AD-a za dva do tri puta (21,77, 88). Neke studije ukazuju na to da topljivi oblik TREM2 nakon proteolitičkog cijepanja

može poticati preživljavanje mikroglije i lučenje proupalnih citokina (87). Njegove koncentracije povišene su u osoba oboljelih od AD-a, ali u nekim studijama takav nalaz nije ponovljen (88,181). Rezultati ovog istraživanja pokazuju da su izmjerene koncentracije sTREM2 u likvoru značajno veće u AD skupini ispitanika u odnosu na MCI i HC skupine, te u MCI u odnosu na HC skupinu, dok analiza koncentracija sTREM2 u plazmi nije pokazala statistički značajne razlike. To nam govori da mjerenje koncentracija u plazmi i u ovom slučaju očekivano nije pokazalo razlike aktivnosti mikroglije između analiziranih skupina ispitanika. Mjerenjima koncentracija u likvoru pokazano da je odgovor urođene imunosti u mozgu ipak značajno jači u AD-u, te da se mikroglija aktivira jače već i u MCI-u u odnosu na normalno „zdravo" starenje. Ranije je zabilježena dinamika promjena koncentracija sTREM2 u likvoru u ovisnosti o stadiju bolesti. Jedna studija pokazala je da su koncentracije sTREM2 bile najviše u MCI u odnosnu na AD i kontrolnu skupinu, što bi moglo značiti da su razine sTREM2 u likvoru odraz odgovora mikroglije na ranu staničnu smrt neurona (89). Drugi autori su pokazali da koncentracije sTREM2 u likvoru uvelike ovise o pojavi patoloških procesa tijekom nastanka i progresije bolesti (90,91). Zabilježene su niže koncentracije sTREM2 u ranim asimptomatskim stadijima bolesti u kojima su prisutne samo niže razine Aβ-a u likvoru, dok su pokazatelji patoloških promjena tau proteina i dalje unutar normalnih vrijednosti, a tek nešto kasnije u tijeku bolesti porastom koncentracija ukupnog i fosforiliranog tau proteina u likvoru rastu i koncentracije sTREM2 (90,91). Poznato je da TREM2 receptor stupa u interakcije s Aβ-om, potiče njegovu fagocitozu (86), a Ewers i suradnici pokazali su i da veće koncentracije sTREM2 u likvoru imaju zaštitni učinak na nakupljanje Aβ-a u AD-u (79). Iako uloga TREM2 u patogenezi AD-a još uvijek nije do kraja razjašnjena postoje naznake da bi u ranim stadijima bolesti TREM2 receptor mogao imati protektivnu ulogu dok bi s napredovanjem bolesti i uključivanjem stečenog imunološkog odgovora mogao imati štetne učinke (86). Nažalost, ovdje nismo bili u mogućnosti napraviti longitudinalnu studiju, te su vrijednosti likvorskih markera izmjerene za svakog ispitanika samo u jednoj vremenskoj točki. Ipak, analiza korelacija vrijednosti sTREM2 i koncentracija Aβ1-42, t-tau i p-tau181 pokazala je međuovisnost aktivnosti glije i patoloških promjena tau proteina. Nije pronađena značajna korelacija koncentracija sTREM2 i Aβ1-42 u likvoru, ali su zato koncentracije sTREM2 bile u pozitivnoj korelaciji s koncentracijama t-tau i p-tau181 proteina. Međuovisnost sTREM2 koncentracija i pokazatelja patoloških promjena tau proteina zabilježena je i ranije, što iznova potvrđuje da TREM2 receptor ima važnu ulogu u patogenezi tauopatija iako bi tu ulogu trebalo detaljnije razjasniti (86). Pozitivna korelacija

vrijednosti sTREM2 i dobi ispitanika ukazuje na veću aktivaciju mikroglije tijekom starenja, a negativna korelacija s brojem MMSE bodova pokazuje da bi sTREM2 mogao biti dobar pokazatelj kognitivnih deficita u AD-u, te da su procesi aktivacije glije i neurodegenerativnih promjena usko povezani. Osim toga, koncentracije sTREM2 u likvoru u pozitivnoj su korelaciji i s koncentracijama ASC proteina u likvoru što ukazuje na moguću povezanost oslobađanja topljivog oblika TREM2 i aktivacije inflamasoma. Nekoliko dosadašnjih istraživanja također ukazuje na uzajaman odnosu TREM2 receptora i aktivacije inflamasoma (81-83, 85). Mikroglija s eksprimiranom R47H varijantom TREM2 gena, čiji nositelji imaju povećani rizik za obolijevanje od AD-a, ima smanjenu mogućnost aktivacije NLRP3 inflamasoma uslijed vezanja liganda na TREM2 receptor (81). Prekomjerna ekspresija TREM2 u makrofaga inhibira aktivaciju NLRP3 inflamasoma (82), dok nedostatak TREM2 značajno pojačava piroptozu makrofaga (83). Spomenute studije ukazuju na protuupalnu i zaštitnu ulogu ekspresije TREM2 receptora. U kontekstu AD-a takva uloga TREM2 receptora značila bi bolju kontrolu upalnog odgovora i zaštitu od prekomjerne aktivacije inflamasoma, no to ne znači da je u svakom trenutku utišavanje upalnih procesa poželjno. Patološke promjene u AD-u očito interakciju navedenih receptora odvode u drugom smjeru te je za primjeren imunosni odgovor vremenski okvir i redoslijed događaja od velike važnosti. U interpretaciji rezultata svakako treba uzeti u obzir i činjenicu da je jedno veće nedavno istraživanje pokazalo da je povećana razina sTREM2 bila značajno povezana s patološkim promjenama bijele tvari, napose zbog bolesti malih krvnih žila (*small vessels disease*) i amiloidne angiopatije, neovisno od stupnja drugih patoloških promjena poput ukupne količine amiloida i tau proteina vizualiziranih PET-om (182). Vrijednosti sTREM2 u likvoru u ovom istraživanju pokazale su se dobrim za razlikovanje zdravih ispitanika od oboljelih od AD-a. Osjetljivost sTREM2 proteina kao biološkog biljega za AD bila je 71,61%, a specifičnost 76,36%, pri izlučnoj vrijednosti od 22344 pg/ml.

Jedna od karakteristika AD-a je i poremećaj metabolizma glukoze (183–185), a jedna novija studija je pokazala da upala izazvana visokim koncentracijama glukoze u BV2 staničnoj liniji mikroglije rezultira povećanom ekspresijom TREM2 receptora i jačom aktivacijom NLRP3 inflamasoma (85). Dodatnim eksperimentima pokazano je da TREM2 receptor modulira upalni odgovor mikroglije izazvan visokim koncentracijama glukoze putem aktivacije NLRP3 inflamasoma (85). Choi i suradnici pokazali su da stanice mikroglije u hipokampusu 5xFAD miša unose značajno više glukoze u odnosu na divlji tip životinja, te da s progresijom bolesti mikroglija

eksprimira veći broj glukoznih transportera (GLUT1 i GLUT2), ima poremećenu glikolizu i povećan stupanj oksidacijske fosforilacije (186). Pored toga, pronašli su i pozitivnu korelaciju između koncentracija sTREM2 u likvoru i unosa glukoze u stanice hipokampusa kod ljudi (186), što bi s obzirom na spomenutu aktivaciju inflamasoma u gliji uslijed visokih koncentracija glukoze mogla biti poveznica između koncentracija sTREM2 i procesa aktivacije inflamasoma u AD-u. U svakom slučaju, očigledno je da su TREM2 signalni put i put aktivacije inflamasoma usko povezani, no i dalje nije dovoljno precizno opisana uloga i međuovisnost topljivog oblika TREM2 receptora i aktivacije inflamasoma. Rezultati ovog istraživanja pokazuju da postoji i pozitivna korelacija koncentracija sTREM2 u likvoru i plazmi što nam govori da stanje na periferiji donekle može ukazivati na stanje u mozgu, iako i druge stanice monocitne linije eksprimiraju TREM2 receptor, te mogu otpuštati sTREM2 u perifernu krv (86). Navedenom bi se činjenicom mogao objasniti već ranije spomenuti nedostatak značajnih razlika u koncentracijama TREM2 u plazmi unatoč očitim razlikama u koncentracijama sTREM2 u likvoru analiziranih skupina ispitanika. Osim toga, takvom nalazu uzrok mogu biti i ranije spomenute prepreke za pouzdanu analizu biljega iz krvi (101), razgradnja proteazama te djelomičan transport biljega iz CNS-a u krv.

6.7. Vrijednosti koncentracija ASC proteina u likvoru i plazmi

Jedan od načina štetnog utjecaja kronično aktivne mikroglije je prekomjerna aktivacija inflamasoma. Franklin i suradnici pokazali su da se uslijed piroptoze agregati ASC proteina nakupljaju izvan stanica gdje dalje mogu uzrokovati porast IL-1β, a mogu izazvati i aktivaciju kaspaze-1 u susjednim stanicama čime posreduju širenje upale (119). Iz tog se razloga sve više istražuje potencijal upalnih medijatora i izvanstaničnog ASC proteina u patogenezi i dijagnostici različitih neuroloških bolesti i stanja (19,124,125,187,188). Naše istraživanje pokazalo je povišene koncentracije ASC proteina u likvoru u AD skupini ispitanika u odnosu na MCI i HC skupinu, dok razlike koncentracija u plazmi nisu bile značajne. Također, nije bilo značajne razlike u koncentracijama ASC proteina u likvoru između MCI i HC skupina. To je pokazatelj da je aktivnost inflamasoma u AD-u jača te da u MCI-u još uvijek ne nastupa značajnija aktivacija inflamasoma i otpuštanje ASC proteina izvan stanica. Iako su koncentracije ASC-a u likvoru značajno više u AD skupini, rezultati analize dijagnostičkog potencijala ASC proteina pokazali su da vrijednosti ASC proteina u likvoru nisu dobar diferencijalno dijagnostički biljeg za razlikovanje

obljelih od AD-a u odnosu na kognitivno zdrave ispitanike, kao što se to ranije pokazalo npr. za razlikovanje MS i TBI skupina (124, 125). Znamo da osim mikroglije i neuroni također eksprimiraju inflamasome. U neuronima je posebice aktivan NLRP1 inflamasom (120), pa veće koncentracije izvanstaničnog ASC-a u AD-u mogu biti i posljedica snažnijeg odumiranja neurona uslijed degenerativnih procesa. Suprotno našim nalazima, jedno nedavno istraživanje pokazalo je povišene koncentracije ASC proteina u serumu ispitanika MCI skupine u odnosu na kontrolnu i AD skupinu (19). Razlog oprečnih rezultata moglo bi biti dulje razdoblje skladištenja uzoraka plazmi u našem istraživanju, kao i relativno mali broj ispitanika u kontrolnoj skupini. Osim toga, prisutnost ASC proteina u perifernoj krvi nije isključivo odraz aktivacije inflamasoma u mozgu, već može biti i pokazatelj upalnih procesa u perifernim tkivima. Osim s već spomenutim koncentracijama sTREM2 u likvoru, koncentracije ASC proteina u likvoru u našem su istraživanju pozitivno korelirale s koncentracijama ASC-a u plazmi te s dobi ispitanika što bi bi se moglo protumačiti na način da sa starenjem aktivacija inflamasoma postaje jača. Slično kao i sTREM2, koncentracije ASC proteina u likvoru našeg uzorka u pozitivnoj su korelaciji s koncentracijama t-tau i p-tau181 što također potvrđuje međuovisnost aktivacije upalnih procesa i patoloških promjena tau proteina. Poznato je da se mikroglija u AD-u aktivira uslijed pojave patološki promijenjenog tau proteina te da patološki oblici tau proteina u neurodegenerativnim bolestima utječu na tijek upale (46,47,58,150), te da također aktivacija mikroglije i upala mogu prethoditi pojavi tau patoloških promjena (63, 64, 151). Dodatno, pokazano je da agregirani oblici tau proteina aktiviraju NLRP3 inflamasom (107). Aktivacija inflamasoma događa se kao posljedica fagocitoze agregiranih oblika tau proteina i nemogućnosti njihove razgradnje u mikrogliji, a predloženo je da na taj način mikroglija sudjeluje i u daljnjem širenju neurofibrilarnih promjena (107). Spomenuta saznanja ukazuju da inflamasom u prostorno bliskim stanicama može biti aktiviran i uslijed unosa agregiranih ASC (119) i promijenjenih tau proteina (107). To dovodi do začaranog kruga širenja upale, kao i širenja patoloških promijena tau proteina putem tau klica (*tau seeds*) za koje se pretpostavlja da djeluju kao šablone (*tau templates*) za patološko smatanje normalnih tau monomera kroz zahvaćena područja mozga. Sažeto, točan slijed te uzročno-posljedični odnosi patoloških promjena aktivacije inflamasoma i tau proteina još uvijek nisu do kraja razjašnjeni, no navedene spoznaje dodatno potvrđuju da su daljnja istraživanja u tom smjeru od velike važnosti.

6.8. Vrijednosti koncentracija imunosnih medijatora u likvoru i plazmi

Poznato je da se imunosni odgovor u mozgu oboljelih od AD-a razlikuje od kognitivno zdravih osoba te se AD stoga također smatra i kroničnom upalnom bolesti (143). Neke promjene imunosnog odgovora moguće je pratiti mjerenjem upalnih medijatora u biološkim tekućinama. Stoga smo ovim istraživanjem htjeli vidjeti koji su od imunosnih medijatora karakteristični za svaku od analiziranih skupina ispitanika (AD, MCI i HC). Za razliku od izmjerenih koncentracija u likvoru, u plazmi smo uspjeli izmjeriti koncentracije svih medijatora osim IL-3, ali su se vrijednosti samo za četiri značajno razlikovale između skupina, što nam govori da u našem slučaju mjerenje koncentracija imunosnih medijatora u plazmi nije pokazalo razlike imunosnog odgovora u osoba s AD ili MCI dijagnozom u odnosu na zdrave kontrole, te da nam koncentracije upalnih medijatora u likvoru daju bolji uvid u imunosna zbivanja u mozgu. Treba napomenuti da je jedan od nedostataka istraživanja taj da za ovaj dio analize nismo imali likvore i plazme istih ispitanika, a također, plazme koje smo uspjeli sakupiti bile su pohranjene nešto dulje razdoblje, dok analizirani likvori nisu bili stariji od tri godine. Dulje vrijeme skladištenja analiziranih plazmi moglo je utjecati na ishod mjerenja.

Analizom likvora uspjeli smo detektirati već spomenutih 35 imunosnih medijatora, no samo se njih 15 značajno razlikovalo između skupina. Četrnaest analita bilo je značajno povišeno u AD skupini. Ako ih u grubo podijelimo na proupalne (CTACK, GRO-α, MIP-1β, TNF-α, IFN-γ, IL-1α, IL-1β, IL-2Rα, IL-3, IL-7, IL-16, IL-17A, IL-18) i protuupalne (IL-4) (31) možemo zaključiti da imunosni odgovor u AD-u ide više u smjeru proupalnih procesa, te da bi nedovoljno lučenje protuupalnih medijatora moglo pridonijeti snažnijem i slabije kontroliranom upalnom odgovoru. Dosadašnja istraživanja koncentracija upalnih medijatora u AD-u pokazala su heterogene i kontradiktorne rezultate (20,98). Razlog tomu bi mogle biti neujednačene metode analiza i rukovanja uzorcima (98). Unatoč tome, dosadašnje studije pokazuju da neke skupine medijatora u likvoru prate sličan trend tijekom progresije AD-a. Naime, IL-1β, IL-6 i TNF-α pokazuju blagi, ali kontinuirani porast s napredovanjem bolesti, IL-18, MCP-1 i IP-10 najviše vrijednosti dostižu u ranim stadijima AD-a ili na prijelazu MCI u AD, dok neki često istraživani medijatori poput IL-1α i IL-2, uopće ne pokazuju promjene s napredovanjem bolesti. Jedna meta-analiza još iz 2010. godine pokazala je da je jedino TGF-β bio značajno povišen u likvoru pacijenata s AD-om, dok su vrijednosti koncentracija IL-6, TNF-α, IL-1β, TGF-β, IL-12 i IL-18 u perifernoj krvi bile značajno

veće u AD ispitanika u odnosu na kontrole (189). Jedna novija meta-analiza iz 2018. godine ističe da su TGF-β, YKL-40 i MCP-1 značajno povišeni u likvoru pacijenata s AD-om, dok koncentracije IL-1β i IL-6 u krvi pokazuju moguću povezanost s AD-om (20).

Rezultati analize likvora u našem istraživanju nisu u potpunosti u skladu s dosad spomenutim rezultatima, te pokazuju da primjena višestruke ELISA metode za mjerenje koncentracija upalnih medijatora u likvoru ipak može dati jasniji uvid u imunosna zbivanja u mozgu. Pojednostavljeno govoreći, koncentracije medijatora mjerene istovremeno u istom uzorku i istom metodom daju veću pouzdanost interpretacije rezultata, kao i mogućnost određivanja profila imunosnih medijatora karakterističnih za pojedinu skupinu ispitanika. U našem slučaju analiza likvora je pokazala da između HC i MCI skupine nije bilo značajne razlike u koncentracijama detektiranih molekula. Gotovo svi medijatori čije su koncentracije bile značajno veće u AD u odnosu na HC skupinu bili su proupalnog karaktera. Ako pobliže pogledamo njihove funkcije IL-1α, IL-1β, IL-3, TNF-α, IL-18 i IFN-γ tipični su proupalni medijatori, potiču reakcije urođene imunosti, lučenje proteina akutne faze, ali i aktivaciju stanica stečene imunosti (31). CTACK, GRO-α i MIP-1β pripadaju skupini kemokina što znači da im je glavna uloga privlačenje imunosnih stanica na mjesto upale (31). CTACK privlači limfocite T te djeluje kao promotor Th1 odgovora. GRO-α privlači neutrofile i leukocite, a MIP-1β T-limfocite, monocite i NK stanice (31).

Povećane koncentracije IL-2Rα, IL-4, IL-7, IL-16, IL-17A svjedoče o velikoj uključenosti stanica stečene imunosti u imunološke procese u AD-u (31). Svi oni, osim IL-4, također djeluju proupalno (31). Pored proupalnog djelovanja, IL-7 utječe i na diferencijaciju i sazrijevanje T i B limfocita te potiče Th1 i Th17 odgovor (190). Od svih spomenutih medijatora, jedino IL-4 ima protuupalno djelovanje, inhibira makrofagima posredovanu upalnu reakciju te potiče diferencijaciju Th2 stanica (31). Nadalje, iako razlike nisu bile statistički značajne, valja napomenuti da su vrijednosti koncentracija najznačajnijih protuupalnih citokina IL-10 i IL-13 bile najniže u AD skupini. Koncentracije većine spomenutih citokina bile su značajno više u AD skupini i u odnosu na MCI skupinu. Jedino se koncentracije IL-3 i kemokina GRO-α nisu značajno razlikovale između AD i MCI skupina što znači da se upalni procesi u oba stanja dosta razlikuju te da s napredovanjem bolesti jača odgovor imunosni sustava. Ipak, u MCI skupini posebno se ističe IP-10, čije su izmjerene koncentracije značajno veće u odnosu na AD skupinu koja je od tri ispitivane grupe imala najniže vrijednosti. Isti trend zabilježen je i ranije gdje su izmjerene koncentracije IP-10 najveće vrijednosti imale u MCI-ju te AD-u s blažim simptomima (većim brojem MMSE bodova),

dok su njegove koncentracije u težim slučajevima AD-a bile niske (191). IP-10 je kemoatraktant za makrofage, NK, ali i T-stanice. Pokazano je da je IP-10 izuzetno važan za generiranje odgovora efektorskih T stanica (192).

Izmjerene koncentracije IL-2Rα, IL-4, IL-16, IL-18, TNF-α, CTACK i MIP-1β u MCI skupini imale su najniže vrijednosti (iako za većinu navedenih medijatora nije bilo statistički značajne razlike između MCI i HC skupine), što nam s obzirom na spomenute funkcije medijatora govori o mogućoj slabijoj uključenosti stanica stečene imunosti u MCI-ju. No, s obzirom da je IP-10 ipak povišen, to može značiti da se u tom stadiju odgovor stečene imunosti tek počinje stvarati, dok je u AD-u već visoko uznapredovao. Iz svega navedenog, može se zaključiti da je imunosni odgovor u AD-u značajno pomaknut na stranu upalnih medijatora, te je narušena ravnoteža upalnih i kompenzatornih procesa. Nedavno istraživanje 27 različitih imunosnih medijatora u likvoru imalo je nešto drugačiji ishod. Koncentracije većine ispitivanih analita bile su značajno povišene u osoba s AD-om, uključujući podjednak broj i pro- i protuupalnih (100). Osim toga, jedina je studija koja ukazuje na moguć zaštitni učinak povećane koncentracije pojedinih proupalnih citokina budući da su koncentracije tih citokina negativno korelirale s napredovanjem bolesti (100). U svakom slučaju, imunosni odgovor u AD-u ne ide isključivo u jednom smjeru što znači da bi se jedino preciznim usmjeravanjem odgovora i vraćanjem ravnoteže cijeloga profila koncentracija pro- i protuupalnih medijatora mogao umanjiti utjecaj imunološkog sustava na nastanak i/ili progresiju bolesti te da se navedeno ne može postići isključivim utišavanjem pojedinih upalnih procesa.

Napravili smo i analize korelacija detektiranih citokina i kemokina s ostalim izmjerenim markerima u likvoru, brojem MMSE bodova i dobi ispitanika. Koncentracije sTREM2 u likvoru u pozitivnoj su korelaciji s koncentracijama IFN-γ, MIG, IL-4, IL-9, MIP-1α, MIP-1β, PDGF-bb, TNF-β što nam govori da je dinamika cijepanja TREM2 receptora i aktivnost glije povezana s otpuštanjem proupalnih, ali i nekih protuupalnih medijatora. Zanimljivo je da su koncentracije Aβ1-42 bile u pozitivnoj korelaciji s IL-1β, GRO-α, PDGF-bb i MIP-1α. To ukazuje na moguću uzročnu povezanost na način da je veća koncentracija spomenutih citokina bila povezana sa slabijim nakupljanjem Aβ-a u mozgu. Navedeni medijatori pretežno su proupalnog karaktera što ukazuje na njihovu moguću zaštitnu ulogu u odnosu na patološke promjene Aβ-a poput oligomerizacije, agregacije i nakupljanja u obliku izvanstaničnih plakova. S druge strane, s koncentracijama Aβ1-42 u negativnoj su korelaciji bile koncentracije MCP-1, M-CSF, MIF i IL-10. Utvrđena je i pozitivna korelacija koncentracija p-tau181 s koncentracijama proupalnih

citokina IFN-γ, IL-1β i IL-7 što potvrđuje ranija saznanja o utjecaju upalnih procesa na patološke promjene tau proteina (46,47,55,150). U našem slučaju povišene koncentracije navedenih citokina bile su povezane s većim stupnjem neurodegeneracije i uznapredovalijim patološkim promjenama tau proteina. Na isti zaključak ukazuje i nalaz da su broj bodova MMSE ljestvice i koncentracije uglavnom proupalnih medijatora uz poneki medijator protuupalnog karaktera (IL-1β, IL-7, IL-2Rα, IL-4, IL-16, IL-18, MIG, EOTAXIN, LIF, MIP-1α, MIP-1β, TNF-β, TRIAL) bili u negativnoj korelaciji, iz čega se može zaključiti da su povećane koncentracije uglavnom upalnih medijatora povezane s kognitivnim deficitom. Čini se da upalni odgovor u AD-u u nekim stadijima bolesti i na jedan dio patoloških promjena može djelovati zaštitno, dok u drugima djeluje štetno i postaje okidač za daljnje napredovanje bolesti. Stoga je za bolje i preciznije mehanicističko razumijevanje kompleksnog imunosnog odgovora u različitim stadijima bolesti potrebno provesti opsežnije i dugoročnije longitudinalne studije, budući da bi se takvim istraživanjima moglo pronaći kritične točke u kojima bi se moduliranjem imunokompetentnih stanica moglo utjecati na tijek bolesti.

Koncentracije ASC proteina u pozitivnoj su korelaciji jedino s koncentracijama IL-3 i IL-6 što potvrđuje da aktivacija inflamasoma potiče lučenje proupalnih citokina. Pomalo je iznenađujući rezultat da ASC koncentracije nisu bile u pozitivnoj korelaciji s razinama IL-1β i IL-18, no taj se nalaz može protumačiti na način da izvanstanične koncentracije ASC-a ne moraju biti isključivo pokazatelj aktivacije inflamasoma. Već smo ranije spomenuli da zbog prisutnosti u neuronima, povećana razina ASC proteina može ukazivati i na neurodegenerativne promjene neurona, što je u skladu s nalazom pozitivne korelacije koncentracije ASC proteina i ukupnog tau proteina.

7. ZAKLJUČCI

1. Za razliku od biljega IBA1, biljezi CD68 i HLA-DR bolje prikazuju jače aktiviranu mikrogliju u tkivu mozga čovjeka. Hipokampalna formacija osoba oboljelih od AD-a jače je zahvaćena upalnim promjena što se očitovalo kao snažnija aktivacija mikroglije posebice u CA1 polju dok je u CA2/3 polju aktivacija bila najniža.

2. Aktivacija NLRP1 inflamasoma nije povezana sa spolom i dobi u kontrolnih niti ispitanika s AD-om, ali je bila jače izražena u HF-u osoba s AD-om u odnosu na kontrole. Neuroni CA2/3 polja pokazuju najjaču aktivaciju NLRP1 inflamasoma, kako u ispitanika s AD-om, tako i u kontrola.

3. Od svih ispitanih biljega povezanih s aktivacijom NLRP1 inflamasoma, izražaj aktivne kaspaze 6 bio je najjači. Aktivacija kaspaze 6 bila je snažnija u AD skupini i najjače izražena u CA2/3 i CA1 polju HF-a. Aktivacija kaspaze 6 u HF-u AD bolesnika povezana je s aktivacijom mikroglije te neurofibrilarnim promjenama što je bilo vidljivo kao prisutnost aktivne mikroglije u nakupinama u obliku grozdova u blizini stanica s aktivnom kaspazom 6 te kao snažna kolokalizacija kaspaze 6 i neurofibrilarnih promjena u neuronima i izvanstaničnim nakupinama.

4. Koncentracije sTREM2 u likvoru bile su značajno veće u bolesnika s AD-om u odnosu na MCI i HC skupinu te su pokazale dobar biomarkerski potencijal za razlučivanje oboljelih od AD-a od zdravih ispitanika. Koncentracije sTREM2 u plazmi nisu se razlikovale između ispitivanih skupina HC, MCI i AD ispitanika.

5. Koncentracije ASC proteina u likvoru bile su značajno veće u bolesnika s AD-om u odnosu na MCI i HC skupinu ispitanika, a koncentracije ASC-a u plazmi nisu se razlikovale između skupina.

6. Koncentracije sTREM2 i ASC proteina u likvoru bile su međusobno u pozitivnoj korelaciji te su vrijednosti oba proteina u likvoru negativno korelirale s brojem MMSE bodova. Koncentracije oba biljega bile su dobar pokazatelj neurodegenerativnih i

neurofibrilarnih promjena jer su pozitivno korelirale s koncentracijama ukupnog i fosforiliranog proteina tau u likvoru.

7. Koncentracije imunosnih medijatora u likvoru pokazuju snažniju upalu te aktivaciju stanica stečene imunosti u AD bolesnika jer su medijatori čije su vrijednosti bile značajno veće u AD bolesnika bili najvećim dijelom proupalnog karaktera, a koncentracije medijatora stečene imunosti također su bile značajno veće u AD-u u odnosu na MCI i HC skupinu. U MCI skupini ističe se povećana vrijednost kemokina IP-10 što može upućivati na početnu fazu aktivacije stanica stečene imunosti. Veće koncentracije pretežno proupalnih citokina bile su statistički značajno povezane s većim stupnjem kognitivnih deficita.

Temeljem analize indikatora upale u postmortalnom tkivu mozga, likvoru i plazmi zaključeno je da je u AD-u aktivacija mikroglije i inflamasoma snažnija u odnosu na MCI i HC skupinu ispitanika te je bolest karakterizirana općenito jačim upalnim odgovorom. Analizom profila citokina ustanovljeno je također da je u AD-u bio prisutan jači odgovor stečene imunosti dok u MCI stadiju još uvijek nije bio toliko zastupljen. Ustanovljeno je da su procesi aktivacije inflamasoma i mikroglije usko povezani s nastankom neurofibrilarnih promjena te da koncentracije sTREM2 proteina u likvoru imaju dobar biomarkerski potencijal za razlučivanje oboljelih od AD-a u odnosu na MCI i HC skupinu ispitanika.

8. SAŽETAK

Neprimjerena aktivacija mikroglije implicirana je u patogenezi Alzheimerove bolesti (AD), ali nije poznato kako dovodi do disfunkcije neurona i spoznajnog urušavanja. Da bismo bolje razjasnili ulogu upalnih procesa u nastanku i progresiji AD-a, pomoću ELISA i multipleks ELISA metode mjerili smo koncentracije imunosnih medijatora i biljega aktivacije mikroglije (sTREM2) i inflamasoma (ASC) u cerebrospinalnoj tekućini (CSF) i plazmi uzoraka izuzetih od osoba s AD-om, blagim spoznajnim poremećajem (MCI) i kognitivno zdravih kontrolnih ispitanika (HC). Dodatno, korištenjem metoda imunohistokemijskog bojenja postmortalnog tkiva mozgova osoba s AD-om i HC-a analizirali smo aktivaciju mikroglije i izraženost inflamasoma. Rezultati su pokazali jaču aktivaciju mikroglije i NLRP1 inflamasoma u hipokampalnoj formaciji osoba s AD-om. Analizom likvorskih biljega utvrđene su veće koncentracije sTREM2 i ASC u bolesnika s AD-om, ako i njihova pozitivna korelacija s biljezima neurodegenerativnih i neurofibrilarnih promjena. Likvor bolesnika s AD-om imao je jasan proupalni profil i povećane koncentracije medijatora stečene imunosti. Zaključno, ova je studija pokazala snažniji imunosni odgovor u bolesnika s AD-om, veću uključenost mehanizama stečene imunosti i visoku korelaciju između aktivacije imunološkog sustava i razvoja neurofibrilarnih promjena.

9. SUMMARY

Association of biomarkers of Alzheimer's disease with inflammatory mediators and activation of microglia and inflammasome

Ena Španić Popovački, mag. biol. exp., 2023

Aberrant microglial activation has been implicated in the pathogenesis of Alzheimer's disease (AD), but how it leads to neuronal dysfunction and cognitive decline is not known. To better clarify the role of inflammatory processes in the development and progression of AD, using ELISA and multiplex ELISA method we measured concentrations of the immune mediators and markers of microglial (sTREM2) and inflammasome (ASC) activation in cerebrospinal fluid (CSF) and plasma samples of AD, mild cognitive impairment, and cognitively healthy control subjects (HC). We also analysed microglial and inflammasome activation using immunohistochemical staining methods in postmortal human brain tissue of the AD and HC subjects. The results have shown stronger microglial and NLRP1 inflammasome activation in the hippocampal formation of the AD subjects. Analysis of the CSF markers has shown higher concentrations of sTREM2 and ASC in patients with AD and their positive correlations with markers of neurodegenerative and tau pathological changes. The CSF of AD patients has a pro-inflammatory profile and increased concentrations of mediators of adaptive immunity. Taken together, this study has shown a stronger immune response in AD patients, higher involvement of adaptive immunity mechanisms, and a high correlation between the activation of the immune system and the development of neurofibrillary changes.

10. LITERATURA

1. Scheltens P, De Strooper B, Kivipelto M, Holstege H, Chételat G, Teunissen CE, i sur. Alzheimer's disease. Lancet 2021;397(10284):1577–90.

2. Patterson C. World Alzheimer Report 2018: The state of the art of dementia research: New frontiers [Internet]. 2018 [pristupljeno: 06.10.2022.]. Dostupno na: https://www.alzint.org/resource/world-alzheimer-report-2018/

3. Jahn H. Memory loss in Alzheimer's disease. Dialogues Clin Neurosci. 2013 Dec;15(4):445-54.

4. Atri A. The Alzheimer's disease clinical spectrum: diagnosis and management. Med Clin North Am. 2019;103(2):263-293.

5. Chiroma SM, Baharuldin MTH, Taib CNM, Amom Z, Jagadeesan S, Moklas MAM. Inflammation in Alzheimer's disease: A friend or foe? Biomed Res Ther. 2018;5(8):2552–64.

6. Šimić G, Babić Leko M, Wray S, Harrington CR, Delalle I, Jovanov-Milošević N, i sur. Monoaminergic neuropathology in Alzheimer's disease. Prog Neurobiol. 2017 Apr;151:101-138.

7. Jonsson T, Atwal JK, Steinberg S, Snaedal J, Jonsson PV, Bjornsson S, i sur. A mutation in APP protects against Alzheimer's disease and age-related cognitive decline. Nature. 2012;488(7409):96-99.

8. Gatz M, Reynolds CA, Fratiglioni L, Johansson B, Mortimer JA, Berg S, i sur. Role of genes and environments for explaining Alzheimer disease. Arch Gen Psychiatry. 2006;63(2):168-174.

9. Giri M, Zhang M, Lü Y. Genes associated with Alzheimer's disease: an overview and current status. Clin Interv Aging. 2016;11:665-681.

10. Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, i sur. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. Science. 1993;261(5123):921-923.

11. Liu CC, Liu CC, Kanekiyo T, Xu H, Bu G. Apolipoprotein E and Alzheimer disease: risk, mechanisms and therapy. Nat Rev Neurol. 2013;9(2):106-118.

12. Braak H, Braak E. Neuropathological stageing of Alzheimer-related changes. Acta Neuropathol. 1991;82(4):239-259.

13. Braak H, Alafuzoff I, Arzberger T, Kretzschmar H, Del Tredici K. Staging of Alzheimer disease-associated neurofibrillary pathology using paraffin sections and immunocytochemistry. Acta Neuropathol. 2006;112(4):389-404.

14. Vogel JW, Young AL, Oxtoby NP, Smith R, Ossenkoppele R, Strandberg OT, i sur. Four distinct trajectories of tau deposition identified in Alzheimer's disease. Nat Med. 2021;27(5):871-881.

15. Braak H, Del Tredici K. The pathological process underlying Alzheimer's disease in individuals under thirty. Acta Neuropathol. 2011;121(2):171-181.

16. Jack CR Jr, Bennett DA, Blennow K, Carrillo MC, Feldman HH, Frisoni GB, i sur. A/T/N: An unbiased descriptive classification scheme for Alzheimer disease biomarkers. Neurology. 2016 Aug 2;87(5):539-47.

17. Babić Leko M, Borovečki F, Dejanović N, Hof PR, Šimić G. Predictive value of cerebrospinal fluid visinin-like protein-1 levels for Alzheimer's disease early detection and differential diagnosis in patients with mild cognitive impairment. J Alzheimers Dis. 2016;50(3):765-778.

18. Dhiman K, Gupta VB, Villemagne VL, Eratne D, Graham PL, Fowler C, i sur. Cerebrospinal fluid neurofilament light concentration predicts brain atrophy and cognition in Alzheimer's disease. Alzheimers Dement (Amst). 2020 Feb 27;12(1):e12005.

19. Scott XO, Stephens ME, Desir MC, Dietrich WD, Keane RW, de Rivero Vaccari JP. The inflammasome adaptor protein asc in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. Int J Mol Sci. 2020;21(13):4674.

20. Chen X, Hu Y, Cao Z, Liu Q, Cheng Y. Cerebrospinal fluid inflammatory cytokine aberrations in Alzheimer's Disease, Parkinson's disease and amyotrophic lateral sclerosis: A systematic review and meta-analysis. Front Immunol. 2018;9:2122.

21. Zhong L, Chen XF. The emerging roles and therapeutic potential of soluble TREM2 in Alzheimer's disease. Front Aging Neurosci. 2019;11:328.

22. Craig-Schapiro R, Perrin RJ, Roe CM, Xiong C, Carter D, Cairns NJ, i sur. YKL-40: a novel prognostic fluid biomarker for preclinical Alzheimer's disease. Biol Psychiatry. 2010 Nov 15;68(10):903-12.

23. Wang L, Gao T, Cai T, Li K, Zheng P, Liu J. Cerebrospinal fluid levels of YKL-40 in prodromal Alzheimer's disease. Neurosci Lett. 2020;715:134658.

24. Bjorkli C, Sandvig A, Sandvig I. Bridging the gap between fluid biomarkers for Alzheimer's disease, Model Systems, and Patients. Front Aging Neurosci. 2020;12:272.

25. Petersen RC, Smith GE, Waring SC, Ivnik RJ, Kokmen E, Tangelos EG. Aging, memory, and mild cognitive impairment. Int Psychogeriatr. 1997;9 Suppl 1:65-69.

26. Anderson ND. State of the science on mild cognitive impairment (MCI). CNS Spectr. 2019;24(1):78-87.

27. Petersen RC. Mild cognitive impairment as a diagnostic entity. J Intern Med. 2004;256(3):183-194.

28. Sanford AM. Mild Cognitive Impairment. Clin Geriatr Med. 2017;33(3):325-337.

29. Croese T, Castellani G, Schwartz M. Immune cell compartmentalization for brain surveillance and protection. Nat Immunol. 2021;22(9):1083-1092.

30. Engelhardt B, Vajkoczy P, Weller RO. The movers and shapers in immune privilege of the CNS. Nat Immunol. 2017;18(2):123-131.

31. Abbas A, Lichtman A, Pillai S. Cellular and mollecular immunology. 9th edition. Philadelphia: Elsevier. 2016

32. Tay TL, Savage JC, Hui CW, Bisht K, Tremblay MÈ. Microglia across the lifespan: from origin to function in brain development, plasticity and cognition. J Physiol. 2017;595(6):1929-1945.

33. von Bernhardi R, Eugenín-von Bernhardi L, Eugenín J. Microglial cell dysregulation in brain aging and neurodegeneration. Front Aging Neurosci. 2015;7:124.

34. Stephenson J, Nutma E, van der Valk P, Amor S. Inflammation in CNS neurodegenerative diseases. Immunology. 2018;154(2):204-219.

35. Vincenti I, Merkler D. New advances in immune components mediating viral control in the CNS. Curr Opin Virol. 2021;47:68-78.

36. Tischer J, Krueger M, Mueller W, Staszewski O, Prinz M, Streit WJ, i sur. Inhomogeneous distribution of Iba-1 characterizes microglial pathology in Alzheimer's disease. Glia. 2016;64(9):1562-1572.

37. Rosa D, Procaccini C, Pucino V, Rosa V De, Marone G, Matarese G. Neuro-endocrine networks controlling immune system in health and disease. Front Immunol. 2014;5.

38. Walker KA, Gottesman RF, Wu A, Knopman DS, Gross AL, Mosley TH Jr, i sur. Systemic inflammation during midlife and cognitive change over 20 years: The ARIC Study. Neurology. 2019;92(11):e1256-e1267.

39. Tucsek Z, Toth P, Sosnowska D, Gautam T, Mitschelen M, Koller A, i sur. 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. 2014;69(10):1212–26.

40. Barrientos RM, Kitt MM, Watkins LR, Maier SF. Neuroinflammation in the normal aging hippocampus. Neuroscience. 2015;309:84-99.

41. Kinney JW, Bemiller SM, Murtishaw AS, Leisgang AM, Salazar AM, Lamb BT. Inflammation as a central mechanism in Alzheimer's disease. Alzheimers Dement (NY). 2018;4:575-590.

42. McQuade A, Blurton-Jones M. Microglia in Alzheimer's disease: exploring how genetics and phenotype influence risk. J Mol Biol. 2019;431(9):1805-1817.

43. Salih DA et al., Genetic variability in response to amyloid beta deposition influences Alzheimer's disease risk. Brain Comm 2019; 1(1):fcz022.

44. Pan XD, Zhu YG, Lin N, Zhang J, Ye QY, Huang HP, i sur. Microglial phagocytosis induced by fibrillar β-amyloid is attenuated by oligomeric β-amyloid: implications for Alzheimer's disease. Mol Neurodegener. 2011;6:45.

45. Maezawa I, Zimin PI, Wulff H, Jin LW. Amyloid-beta protein oligomer at low nanomolar concentrations activates microglia and induces microglial neurotoxicity. J Biol Chem. 2011;286(5):3693-3706.

46. Zilka N, Stozicka Z, Kovac A, Pilipcinec E, Bugos O, Novak M. Human misfolded truncated tau protein promotes activation of microglia and leukocyte infiltration in the transgenic rat model of tauopathy. J Neuroimmunol. 2009;209(1-2):16-25.

47. Zilka N, Kazmerova Z, Jadhav S, Neradil P, Madari A, Obetkova D, i sur. Who fans the flames of Alzheimer's disease brains? Misfolded tau on the crossroad of neurodegenerative and inflammatory pathways. J Neuroinflammation. 2012;9:47.

48. Heurtaux T, Michelucci A, Losciuto S, Gallotti C, Felten P, Dorban G, i sur. Microglial activation depends on beta-amyloid conformation: role of the formylpeptide receptor 2. J Neurochem. 2010;114(2):576-586.

49. Dani M, Wood M, Mizoguchi R, Fan Z, Walker Z, Morgan R, i sur. Microglial activation correlates in vivo with both tau and amyloid in Alzheimer's disease. Brain. 2018;141(9):2740-2754.

50. Šimić G, Španić E, Langer Horvat L, Hof PR. Blood-brain barrier and innate immunity in the pathogenesis of Alzheimer's disease. Prog Mol Biol Transl Sci. 2019;168:99-145.

51. Cai Z, Hussain MD, Yan LJ. Microglia, neuroinflammation, and beta-amyloid protein in Alzheimer's disease. Int J Neurosci. 2014;124(5):307-321.

52. Patel NS, Paris D, Mathura V, Quadros AN, Crawford FC, Mullan MJ. Inflammatory cytokine levels correlate with amyloid load in transgenic mouse models of Alzheimer's disease. J Neuroinflammation. 2005;2(1):9.

53. Garção P, Oliveira CR, Agostinho P. Comparative study of microglia activation induced by amyloid-beta and prion peptides: role in neurodegeneration. J Neurosci Res. 2006;84(1):182-193.

54. Ries M, Sastre M. Mechanisms of Aβ clearance and degradation by glial cells. Front Aging Neurosci. 2016;8:160.

55. Lindberg C, Selenica ML, Westlind-Danielsson A, Schultzberg M. Beta-amyloid protein structure determines the nature of cytokine release from rat microglia. J Mol Neurosci. 2005;27(1):1-12.

56. Sondag CM, Dhawan G, Combs CK. Beta amyloid oligomers and fibrils stimulate differential activation of primary microglia. J Neuroinflammation. 2009;6:1.

57. Duan W, Zou J, Chen X, Xiao C, Jiang W. Biglycan expression promotes β-amyloid-induced microglial activation via TLR2 in mouse cell culture model. Clin Lab. 2021;67(1):10.7754

58. Sasaki A, Kawarabayashi T, Murakami T, Matsubara E, Ikeda M, Hagiwara H, i sur. Microglial activation in brain lesions with tau deposits: comparison of human tauopathies and tau transgenic mice TgTauP301L. Brain Res. 2008;1214:159-168.

59. Laurent C, Buée L, Blum D. Tau and neuroinflammation: What impact for Alzheimer's disease and tauopathies?. Biomed J. 2018;41(1):21-33.

60. Jin M, Shiwaku H, Tanaka H, Obita T, Ohuchi S, Yoshioka Y, i sur. Tau activates microglia via the PQBP1-cGAS-STING pathway to promote brain inflammation. Nat Commun. 2021;12:6565.

61. Braak H, Braak E. Staging of Alzheimer's disease-related neurofibrillary changes. Neurobiol Aging. 1995;16(3):271-284.

62. Sun XY, Li LJ, Dong QX, Zhu J, Huang YR, Hou SJ, i sur. Rutin prevents tau pathology and neuroinflammation in a mouse model of Alzheimer's disease. J Neuroinflammation. 2021;18(1):131.

63. Yoshiyama Y, Higuchi M, Zhang B, Huang SM, Iwata N, Saido TC, i sur. Synapse loss and microglial activation precede tangles in a P301S tauopathy mouse model. Neuron. 2007 Feb;53(3):337-351.

64. Ghosh S, Wu MD, Shaftel SS, Kyrkanides S, LaFerla FM, Olschowka JA, i sur. Sustained interleukin-1β overexpression exacerbates tau pathology despite reduced amyloid burden in an Alzheimer's mouse model. J Neurosci. 2013;33(11):5053-5064.

65. Bhaskar K, Konerth M, Kokiko-Cochran ON, Cardona A, Ransohoff RM, Lamb BT. Regulation of tau pathology by the microglial fractalkine receptor. Neuron. 2010;68(1):19-31.

66. Maphis N, Xu G, Kokiko-Cochran ON, Jiang S, Cardona A, Ransohoff RM, i sur. Reactive microglia drive tau pathology and contribute to the spreading of pathological tau in the brain. Brain. 2015;138(Pt 6):1738-1755.

67. Bemiller SM, McCray TJ, Allan K, Formica SV, Xu G, Wilson G, i sur. TREM2 deficiency exacerbates tau pathology through dysregulated kinase signaling in a mouse model of tauopathy. Mol Neurodegener. 2017;12(1):74.

68. Hall GF, Patuto BA. Is tau ready for admission to the prion club? Prion. 2012 Jul 1;6(3):223-33.

69. Walker LC, Jucker M. Neurodegenerative diseases: expanding the prion concept. Annu Rev Neurosci. 2015;38:87-103.

70. Asai H, Ikezu S, Tsunoda S, Medalla M, Luebke J, Haydar T, i sur. Depletion of microglia and inhibition of exosome synthesis halt tau propagation. Nat Neurosci. 2015;18(11):1584-93.

71. Hopp SC, Lin Y, Oakley D, Roe AD, DeVos SL, Hanlon D, i sur. The role of microglia in processing and spreading of bioactive tau seeds in Alzheimer's disease. J Neuroinflammation. 2018;15(1):269.

72. Tang Y, Le W. Differential roles of M1 and M2 Microglia in neurodegenerative diseases. Mol Neurobiol. 2016;53(2):1181-1194.

73. Keren-Shaul H, Spinrad A, Weiner A, Matcovitch-Natan O, Dvir-Szternfeld R, Ulland TK, i sur. A unique microglia type associated with restricting development of Alzheimer's disease. Cell. 2017;169(7):1276-1290.e17.

74. Rangaraju S, Dammer EB, Raza SA, Rathakrishnan P, Xiao H, Gao T, i sur. Identification and therapeutic modulation of a pro-inflammatory subset of disease-associated-microglia in Alzheimer's disease. Mol Neurodegener. 2018;13(1):24.

75. Friedman BA, Srinivasan K, Ayalon G, Meilandt WJ, Lin H, Huntleyi MA, i sur. Diverse brain myeloid expression profiles reveal distinct microglial activation states and aspects of Alzheimer's disease Not Evident in Mouse Models. Cell Rep. 2018;22(3):832-847.

76. Gerrits E, Brouwer N, Kooistra SM, Woodbury ME, Vermeiren Y, Lambourne M, i sur. Distinct amyloid-β and tau-associated microglia profiles in Alzheimer's disease. Acta Neuropathol. 2021;141(5):681-696.

77. Jay TR, von Saucken VE, Landreth GE. TREM2 in neurodegenerative diseases. Mol Neurodegener. 2017;12(1):56.

78. Wang Y, Ulland TK, Ulrich JD, Song W, Tzaferis JA, Hole JT, i sur. TREM2-mediated early microglial response limits diffusion and toxicity of amyloid plaques. J Exp Med. 2016;213(5):667-675.

79. Ewers M, Biechele G, Suárez-Calvet M, Sacher C, Blume T, Morenas-Rodriguez E, i sur. Higher CSF sTREM2 and microglia activation are associated with slower rates of beta-amyloid accumulation. EMBO Mol Med. 2020;12(9):e12308.

80. Lee CYD, Daggett A, Gu X, Jiang LL, Langfelder P, Li X, i sur. Elevated TREM2 gene dosage reprograms microglia responsivity and ameliorates pathological phenotypes in Alzheimer's disease models. Neuron. 2018;97(5):1032-1048.e5.

81. Cosker K, Mallach A, Limaye J, Piers TM, Staddon J, Neame SJ, i sur. Microglial signalling pathway deficits associated with the patient derived R47H TREM2 variants linked to AD indicate inability to activate inflammasome. Sci Rep. 2021;11(1):13316.

82. Yang S, Yang Y, Wang F, Luo QY, Zhang Y, Zheng F, i sur. TREM2 dictates antibacterial defense and viability of bone marrow-derived macrophages during bacterial infection. Am J Respir Cell Mol Biol. 2021;65(2):176-188.

83. Wang Y, Cao C, Zhu Y, Fan H, Liu Q, Liu Y, i sur. TREM2/β-catenin attenuates NLRP3 inflammasome-mediated macrophage pyroptosis to promote bacterial clearance of pyogenic bacteria. Cell Death Dis. 2022;13(9):771.

84. Jay TR, Miller CM, Cheng PJ, Graham LC, Bemiller S, Broihier ML, i sur. TREM2 deficiency eliminates TREM2+ inflammatory macrophages and ameliorates pathology in Alzheimer's disease mouse models. J Exp Med. 2015;212(3):287-95.

85. Li Y, Long W, Gao M, Jiao F, Chen Z, Liu M, i sur. TREM2 regulates high glucose-induced microglial inflammation via the NLRP3 signaling pathway. Brain Sci. 2021;11(7):896.

86. Yang J, Fu Z, Zhang X, Xiong M, Meng L, Zhang Z. TREM2 ectodomain and its soluble form in Alzheimer's disease. J Neuroinflammation. 2020;17(1):204.

87. Zhong L, Chen XF, Wang T, Wang Z, Liao C, Wang Z, i sur. Soluble TREM2 induces inflammatory responses and enhances microglial survival. J Exp Med. 2017;214(3):597-607.

88. Ulrich JD, Ulland TK, Colonna M, Holtzman DM. Elucidating the role of TREM2 in Alzheimer's disease. Neuron. 2017;94(2):237-248.

89. Suárez-Calvet M, Kleinberger G, Araque Caballero MÁ, Brendel M, Rominger A, Alcolea D, i sur. sTREM2 cerebrospinal fluid levels are a potential biomarker for microglia activity in early-stage Alzheimer's disease and associate with neuronal injury markers. EMBO Mol Med. 2016;8(5):466-476.

90. Suárez-Calvet M, Morenas-Rodríguez E, Kleinberger G, Schlepckow K, Araque Caballero MA, Franzmeier N, i sur. Early increase of CSF sTREM2 in Alzheimer's disease is associated with tau related-neurodegeneration but not with amyloid-β pathology. Mol Neurodegener. 2019;14(1):1.

91. Ma LZ, Tan L, Bi YL, Shen XN, Xu W, Ma YH, i sur. Dynamic changes of CSF sTREM2 in preclinical Alzheimer's disease: the CABLE study. Mol Neurodegener. 2020;15(1):25.

92. Zheng C, Zhou XW, Wang JZ. The dual roles of cytokines in Alzheimer's disease: update on interleukins, TNF-α, TGF-β and IFN-γ. Transl Neurodegener. 2016;5:7.

93. Dhapola R, Hota SS, Sarma P, Bhattacharyya A, Medhi B, Reddy DH. Recent advances in molecular pathways and therapeutic implications targeting neuroinflammation for Alzheimer's disease. Inflammopharmacology. 2021;29(6):1669-1681.

94. Chakrabarty P, Herring A, Ceballos-Diaz C, Das P, Golde TE. Hippocampal expression of murine TNFα results in attenuation of amyloid deposition in vivo. Mol Neurodegener. 2011;6:16.

95. Li Y, Liu L, Barger SW, Griffin WS. Interleukin-1 mediates pathological effects of microglia on tau phosphorylation and on synaptophysin synthesis in cortical neurons through a p38-MAPK pathway. J Neurosci. 2003;23(5):1605-1611.

96. Ojala JO, Sutinen EM, Salminen A, Pirttilä T. Interleukin-18 increases expression of kinases involved in tau phosphorylation in SH-SY5Y neuroblastoma cells. J Neuroimmunol. 2008;205(1-2):86-93.

97. Sutinen EM, Pirttilä T, Anderson G, Salminen A, Ojala JO. Pro-inflammatory interleukin-18 increases Alzheimer's disease-associated amyloid-β production in human neuron-like cells. J Neuroinflammation. 2012;9:199.

98. Brosseron F, Krauthausen M, Kummer M, Heneka MT. Body fluid cytokine levels in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease: a comparative overview. Mol Neurobiol. 2014 Oct;50(2):534-44.

99. Ott BR, Jones RN, Daiello LA, de la Monte SM, Stopa EG, Johanson CE, i sur. Blood-cerebrospinal fluid barrier gradients in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease: Relationship to inflammatory cytokines and chemokines. Front Aging Neurosci. 2018 Aug 21;10:245.

100. Taipa R, das Neves SP, Sousa AL, Fernandes J, Pinto C, Correia AP, i sur. Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines in the CSF of patients with Alzheimer's disease and their correlation with cognitive decline. Neurobiol Aging. 2019;76:125-132.

101. Huang S, Wang YJ, Guo J. Biofluid biomarkers of Alzheimer's disease: Progress, problems, and perspectives. Neurosci Bull. 2022 Jun;38(6):677-691.

102. Halle A, Hornung V, Petzold GC, Stewart CR, Monks BG, Reinheckel T, i sur. The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid-beta. Nat Immunol. 2008;9(8):857-865.

103. Pontillo A, Catamo E, Arosio B, Mari D, Crovella S. NALP1/NLRP1 genetic variants are associated with Alzheimer disease. Alzheimer Dis Assoc Disord. 2012;26(3):277-281.

104. Strowig T, Henao-Mejia J, Elinav E, Flavell R. Inflammasomes in health and disease. Nature. 2012;481(7381):278-286.

105. Heneka MT, Kummer MP, Stutz A, Delekate A, Schwartz S, Saecker AV, i sur. NLRP3 is activated in Alzheimer's disease and contributes to pathology in APP/PS1 mice. Nature. 2013;493(7434):674-678.

106. Tan MS, Tan L, Jiang T, Zhu XC, Wang HF, Jia CD, i sur. Amyloid-β induces NLRP1-dependent neuronal pyroptosis in models of Alzheimer's disease. Cell Death Dis. 2014 Aug 21;5(8):e1382.

107. Stancu IC, Cremers N, Vanrusselt H, Couturier J, Vanoosthuyse A, Kessels S, i sur. Aggregated Tau activates NLRP3-ASC inflammasome exacerbating exogenously seeded and non-exogenously seeded Tau pathology in vivo. Acta Neuropathol. 2019;137(4):599-617.

108. Ising C, Venegas C, Zhang S, Scheiblich H, Schmidt SV, Vieira-Saecker A, i sur. NLRP3 inflammasome activation drives tau pathology. Nature. 2019;575(7784):669-673.

109. Yap JKY, Pickard BS, Chan EWL, Gan SY. The Role of Neuronal NLRP1 inflammasome in Alzheimer's disease: Bringing neurons into the neuroinflammation game. Mol Neurobiol. 2019;56(11):7741-7753.

110. Kelley N, Jeltema D, Duan Y, He Y. The NLRP3 inflammasome: An overview of mechanisms of activation and regulation. Int J Mol Sci. 2019 Jul 6;20(13):3328.

111. Swanson KV, Deng M, Ting JP. The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation to therapeutics. Nat Rev Immunol. 2019 Aug;19(8):477-489.

112. Murphy N, Grehan B, Lynch MA. Glial uptake of amyloid beta induces NLRP3 inflammasome formation via cathepsin-dependent degradation of NLRP10. Neuromolecular Med. 2014;16(1):205-215.

113. Venegas C, Kumar S, Franklin BS, Dierkes T, Brinkschulte R, Tejera D, i sur. Microglia-derived ASC specks cross-seed amyloid-β in Alzheimer's disease. Nature. 2017;552(7685):355-361.

114. Dansokho C, Heneka MT. Neuroinflammatory responses in Alzheimer's disease. J Neural Transm. 2018;125(5):771-779.

115. Lučiūnaitė A, McManus RM, Jankunec M, Rácz I, Dansokho C, Dalgėdienė I, i sur. Soluble Aβ oligomers and protofibrils induce NLRP3 inflammasome activation in microglia. J Neurochem. 2020;155(6):650-661.

116. Dempsey C, Rubio Araiz A, Bryson KJ, Finucane O, Larkin C, Mills EL, i sur. Inhibiting the NLRP3 inflammasome with MCC950 promotes non-phlogistic clearance of amyloid-β and cognitive function in APP/PS1 mice. Brain Behav Immun. 2017;61:306-316.

117. Li Q, Chen L, Liu X, Li X, Cao Y, Bai Y, i sur. Pterostilbene inhibits amyloid-β-induced neuroinflammation in a microglia cell line by inactivating the NLRP3/caspase-1 inflammasome pathway. J Cell Biochem. 2018;119(8):7053-7062.

118. Španić E, Langer Horvat L, Hof PR, Šimić G. Role of microglial cells in Alzheimer's disease tau propagation. Front Aging Neurosci. 2019;11:271.

119. Franklin BS, Bossaller L, De Nardo D, Ratter JM, Stutz A, Engels G, i sur. The adaptor ASC has extracellular and 'prionoid' activities that propagate inflammation. Nat Immunol. 2014;15(8):727-737.

120. Kummer JA, Broekhuizen R, Everett H, Kuijk L, Martinon F, van Bruggen R, i sur. Inflammasome components NALP 1 and 3 show distinct but separate expression profiles in human tissues suggesting a site-specific role in the inflammatory response. J Histochem Cytochem. 2007;55(5):443-452.

121. Guo H, Pétrin D, Zhang Y, Bergeron C, Goodyer CG, LeBlanc AC. Caspase-1 activation of caspase-6 in human apoptotic neurons. Cell Death Differ. 2006;13(2):285-292.

122. Kaushal V, Dye R, Pakavathkumar P, Foveau B, Flores J, Hyman B, i sur. Neuronal NLRP1 inflammasome activation of Caspase-1 coordinately regulates inflammatory interleukin-1-beta production and axonal degeneration-associated Caspase-6 activation. Cell Death Differ. 2015;22(10):1676-1686.

123. Saresella M, La Rosa F, Piancone F, Zoppis M, Marventano I, Calabrese E, i sur. The NLRP3 and NLRP1 inflammasomes are activated in Alzheimer's disease. Mol Neurodegener. 2016 Mar 3;11:23. doi: 10.1186/s13024-016-0088-1.

124. Keane RW, Dietrich WD, de Rivero Vaccari JP. Inflammasome proteins as biomarkers of multiple sclerosis. Front Neurol. 2018;9:135. Published 2018 Mar 19.

125. Kerr N, Lee SW, Perez-Barcena J, Crespi C, Ibañez J, Bullock MR, i sur. Inflammasome proteins as biomarkers of traumatic brain injury. PLoS One. 2018;13(12):e0210128.

126. Chen Y, Colonna M. Spontaneous and induced adaptive immune responses in Alzheimer's disease: new insights into old observations. Curr Opin Immunol. 2022;77:102233.

127. Absinta M, Ha SK, Nair G, Sati P, Luciano NJ, Palisoc M, Louveau A, Zaghloul KA, Pittaluga S, Kipnis J, Reich DS. Human and nonhuman primate meninges harbor lympatic vessels that can be visualized noninvasively by MRI. Elife. 2017 Oct 3;6

128. Pascual G, Wadia JS, Zhu X, et al. Immunological memory to hyperphosphorylated tau in asymptomatic individuals. Acta Neuropathol. 2017;133(5):767-783.

129. St-Amour I, Bosoi CR, Paré I, Arokia Doss PMI, Rangachari M, Hébert SS, i sur. Peripheral adaptive immunity of the triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease. J Neuroinflammation. 2019;16(1):3.

130. Marsh SE, Abud EM, Lakatos A, Karimzadeh A, Yeung ST, Davtyan H, i sur. The adaptive immune system restrains Alzheimer's disease pathogenesis by modulating microglial function. Proc Natl Acad Sci U S A. 2016;113(9):E1316-E1325.

131. Gate D, Saligrama N, Leventhal O, Yang AC, Unger MS, Middeldorp J, i sur. Clonally expanded CD8 T cells patrol the cerebrospinal fluid in Alzheimer's disease. Nature. 2020;577(7790):399-404.

132. Pasciuto E, Burton OT, Roca CP, Lagou V, Rajan WD, Theys T, i sur. Microglia require CD4 T cells to complete the fetal-to-adult transition. Cell. 2020;182(3):625-640.e24.

133. Mirra SS, Heyman A, McKeel D, et al. The Consortium to establish a registry for Alzheimer's disease (CERAD). Part II. Standardization of the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease. Neurology. 1991;41(4):479-486.

134. Hyman BT, Phelps CH, Beach TG, Bigio EH, Cairns NJ, Carrillo MC, et al. National institute on aging-Alzheimer's association guidelines for the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease. Alzheimer's Dement 2012;8(1):1–13.

135. Montine TJ, Phelps CH, Beach TG, Bigio EH, Cairns NJ, Dickson DW, et al. National institute on aging-Alzheimer's association guidelines for the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease: A practical approach. Acta Neuropathol 2012;123(1):1–11.

136. Petersen RC, Smith GE, Waring SC, Ivnik RJ, Tangalos EG, Kokmen E. Mild cognitive impairment: Clinical characterization and outcome. Arch Neurol 1999;56(3):303–8.

137. Albert MS, DeKosky ST, Dickson D, Dubois B, Feldman HH, Fox NC, et al. 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 2011;7(3):270–9.

138. Babić Leko M, Nikolac Perković M, Klepac N, Švob Štrac D, Borovečki F, Pivac N, i sur. IL-1β, IL-6, IL-10, and TNFα single nucleotide polymorphisms in human

influence the susceptibility to Alzheimer's disease pathology. J Alzheimers Dis 2020;75(3):1029-1047.

139. West MJ, Kawas CH, Stewart WF, Rudow GL, Troncoso JC. Hippocampal neurons in pre-clinical Alzheimer's disease. Neurobiol Aging. 2004;25(9):1205-1212.

140. Hendrickx DAE, van Eden CG, Schuurman KG, Hamann J, Huitinga I. Staining of HLA-DR, Iba1 and CD68 in human microglia reveals partially overlapping expression depending on cellular morphology and pathology. J Neuroimmunol. 2017;309:12-22.

141. Taipa R, Brochado P, Robinson A, Reis I, Costa P, Mann DM, i sur. Patterns of microglial cell activation in Alzheimer Disease and frontotemporal lobar degeneration. Neurodegener Dis. 2017;17(4-5):145-154.

142. Bachstetter AD, Van Eldik LJ, Schmitt FA, Neltner JH, Ighodaro ET, Webster SJ, i sur. Disease-related microglia heterogeneity in the hippocampus of Alzheimer's disease, dementia with Lewy bodies, and hippocampal sclerosis of aging. Acta Neuropathol Commun. 2015;3:32.

143. Zotova E, Nicoll JA, Kalaria R, Holmes C, Boche D. Inflammation in Alzheimer's disease: relevance to pathogenesis and therapy. Alzheimers Res Ther. 2010;2(1):1.

144. Hof PR, Bussière T, Gold G, Kövari E, Giannakopoulos P, Bouras C, i sur. Stereologic evidence for persistence of viable neurons in layer II of the entorhinal cortex and the CA1 field in Alzheimer disease. J Neuropathol Exp Neurol. 2003;62(1):55-67.

145. Zhang L, Jiang Y, Zhu J, Liang H, He X, Qian J, i sur. Quantitative assessment of hippocampal tau pathology in AD and PART. J Mol Neurosci. 2020;70(11):1808-1811.

146. Cherry JD, Esnault CD, Baucom ZH, Tripodis Y, Huber BR, Alvarez VE, i sur. Tau isoforms are differentially expressed across the hippocampus in chronic traumatic encephalopathy and Alzheimer's disease. Acta Neuropathol Commun. 2021;9(1):86.

147. Španić E, Langer Horvat L, Ilić K, Hof PR, Šimić G. NLRP1 Inflammasome activation in the hippocampal formation in Alzheimer's disease: Correlation with neuropathological changes and unbiasedly estimated neuronal loss. Cells. 2022;11(14):2223.

148. Šimić G, Lucassen PJ, Krsnik Ž, Krušlin B, Kostović I, Winblad B, i sur. nNOS expression in reactive astrocytes correlates with increased cell death related DNA damage

in the hippocampus and entorhinal cortex in Alzheimer's disease. Exp Neurol. 2000;165(1):12-26.

149. Frisoni GB, Ganzola R, Canu E, Rüb U, B Pizzini FP, Alessandrini F, i sur. Mapping local hippocampal changes in Alzheimer's disease and normal ageing with MRI at 3 Tesla. Brain. 2008;131(Pt 12):3266-3276.

150. Bellucci A, Westwood AJ, Ingram E, Casamenti F, Goedert M, Spillantini MG. Induction of inflammatory mediators and microglial activation in mice transgenic for mutant human P301S tau protein. Am J Pathol. 2004;165(5):1643-1652.

151. Sheffield LG, Marquis JG, Berman NE. Regional distribution of cortical microglia parallels that of neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. Neurosci Lett. 2000;285(3):165-168.

152. Tsu BV, Beierschmitt C, Ryan AP, Agarwal R, Mitchell PS, Daugherty MD. Diverse viral proteases activate the NLRP1 inflammasome. Elife. 2021;10:e60609.

153. Zhang J, Pei L, Zang D, Xue Y, Wang X, Chen Y, i sur. Gender differences of NLRP1 inflammasome in mouse model of Alzheimer's disease. Front Aging Neurosci. 2020;12:512097.

154. Faustin B, Lartigue L, Bruey JM, Luciano F, Sergienko E, Bailly-Maitre B, i sur. Reconstituted NALP1 inflammasome reveals two-step mechanism of caspase-1 activation. Mol Cell. 2007;25(5):713-724.

155. McKenzie BA, Dixit VM, Power C. Fiery Cell Death: Pyroptosis in the central nervous system. Trends Neurosci. 2020;43(1):55-73.

156. Rühl S, Shkarina K, Demarco B, Heilig R, Santos JC, Broz P. ESCRT-dependent membrane repair negatively regulates pyroptosis downstream of GSDMD activation. Science. 2018;362(6417):956-960.

157. Zhang Y, Goodyer C, LeBlanc A. Selective and protracted apoptosis in human primary neurons microinjected with active caspase-3, -6, -7, and -8. J Neurosci. 2000;20(22):8384-8389.

158. Raina AK, Hochman A, Zhu X, Rottkamp CA, Nunomura A, Siedlak SL, i sur. Abortive apoptosis in Alzheimer's disease. Acta Neuropathol. 2001;101(4):305-310.

159. Guo H, Albrecht S, Bourdeau M, Petzke T, Bergeron C, LeBlanc AC. Active caspase-6 and caspase-6-cleaved tau in neuropil threads, neuritic plaques, and neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. Am J Pathol. 2004;165(2):523-531.

160. Klaiman G, Petzke TL, Hammond J, Leblanc AC. Targets of caspase-6 activity in human neurons and Alzheimer disease. Mol Cell Proteomics. 2008;7(8):1541-1555.

161. Zhai L, Shen H, Sheng Y, Guan Q. ADMSC Exo-MicroRNA-22 improve neurological function and neuroinflammation in mice with Alzheimer's disease. J Cell Mol Med. 2021 Dec;25(23):11037-11038.

162. Jia J, Zhang X, Xu G, Zeng X, Li L. Thioredoxin-1 inhibits amyloid-β25-35-induced activation of NLRP1/caspase-1/GSDMD pyroptotic pathway in PC12 cells. Mol Biol Rep. 2022;49(5):3445-3452.

163. Tsuchiya K, Nakajima S, Hosojima S, Nguyen DT, Hattori T, Le TM, i sur. Caspase-1 initiates apoptosis in the absence of gasdermin D. Nat Commun. 2019;10(1):2091.

164. Chan AH, Schroder K. Inflammasome signaling and regulation of interleukin-1 family cytokines. J Exp Med. 2020;217(1):e20190314.

165. LeBlanc A, Liu H, Goodyer C, Bergeron C, Hammond J. Caspase-6 role in apoptosis of human neurons, amyloidogenesis, and Alzheimer's disease. J Biol Chem. 1999;274(33):23426-23436.

166. Albrecht S, Bourdeau M, Bennett D, Mufson EJ, Bhattacharjee M, LeBlanc AC. Activation of caspase-6 in aging and mild cognitive impairment. Am J Pathol. 2007;170(4):1200-1209.

167. Ramcharitar J, Albrecht S, Afonso VM, Kaushal V, Bennett DA, Leblanc AC. Cerebrospinal fluid tau cleaved by caspase-6 reflects brain levels and cognition in aging and Alzheimer disease. J Neuropathol Exp Neurol. 2013 Sep;72(9):824-32.

168. Theofilas P, Ehrenberg AJ, Nguy A, Thackrey JM, Dunlop S, Mejia MB, i sur. Probing the correlation of neuronal loss, neurofibrillary tangles, and cell death markers across the Alzheimer's disease Braak stages: a quantitative study in humans. Neurobiol Aging. 2018;61:1-12.

169. Noël A, Foveau B, LeBlanc AC. Caspase-6-cleaved Tau fails to induce Tau hyperphosphorylation and aggregation, neurodegeneration, glial inflammation, and cognitive deficits. Cell Death Dis. 2021;12(3):227.

170. Godefroy N, Foveau B, Albrecht S, Goodyer CG, LeBlanc AC. Expression and activation of caspase-6 in human fetal and adult tissues. PLoS One. 2013;8(11):79313.

171. LeBlanc AC, Ramcharitar J, Afonso V, Hamel E, Bennett DA, Pakavathkumar P, i sur. Caspase-6 activity in the CA1 region of the hippocampus induces age-dependent memory impairment. Cell Death Differ. 2014;21(5):696-706.

172. Sun D, Gao G, Zhong B, Zhang H, Ding S, Sun Z, i sur. NLRP1 inflammasome involves in learning and memory impairments and neuronal damages during aging process in mice. Behav Brain Funct. 2021;17(1):11.

173. Šimic G, Bexheti S, Kelović Z, Zhang H, Ding S, Sun Z, i sur. Hemispheric asymmetry, modular variability and age-related changes in the human entorhinal cortex. Neuroscience. 2005;130(4):911-925.

174. Boscia F, Esposito CL, Di Crisci A, de Franciscis V, Annunziato L, Cerchia L. GDNF selectively induces microglial activation and neuronal survival in CA1/CA3 hippocampal regions exposed to NMDA insult through Ret/ERK signalling. PLoS One. 2009;4(8):e6486.

175. Rayamajhi M, Miao EA. Just say NO to NLRP3. Nat Immunol. 2013;14(1):12-14.

176. Jiang M, Wang H, Liu Z, Lin L, Wang L, Xie M, i sur. Endoplasmic reticulum stress-dependent activation of iNOS/NO-NF-κB signaling and NLRP3 inflammasome contributes to endothelial inflammation and apoptosis associated with microgravity. FASEB J. 2020;34(8):10835-10849.

177. Šimić G, Babić Leko M, Wray S, Harrington C, Delalle I, Jovanov-Milošević N, i sur. Tau protein hyperphosphorylation and aggregation in Alzheimer's disease and other tauopathies, and possible neuroprotective strategies. Biomolecules. 2016;6(1):6.

178. Mao K, Chen S, Chen M, Ma Y, Wang Y, Huang B, i sur. Nitric oxide suppresses NLRP3 inflammasome activation and protects against LPS-induced septic shock. Cell Res. 2013;23(2):201-212.

179. Mishra BB, Rathinam VA, Martens GW, Martinot AJ, Kornfeld H, Fitzgerald KA, i sur. Nitric oxide controls the immunopathology of tuberculosis by inhibiting NLRP3 inflammasome-dependent processing of IL-1β. Nat Immunol. 2013;14(1):52-60.

180. Lana D, Ugolini F, Giovannini MG. An overview on the differential interplay among neurons-astrocytes-microglia in CA1 and CA3 hippocampus in hypoxia/ischemia. Front Cell Neurosci. 2020;14:585833.

181. Heslegrave A, Heywood W, Paterson R, Magdalinou N, Svensson J, Johansson P, i sur. Increased cerebrospinal fluid soluble TREM2 concentration in Alzheimer's disease. Mol Neurodegener. 2016;11:3.

182. Tsai HH, Chen YF, Yen RF, et al. Plasma soluble TREM2 is associated with white matter lesions independent of amyloid and tau. Brain. 2021;144(11):3371-3380.

183. Chen Z, Zhong C. Decoding Alzheimer's disease from perturbed cerebral glucose metabolism: implications for diagnostic and therapeutic strategies. Prog Neurobiol. 2013;108:21-43.

184. An Y, Varma VR, Varma S, Casanova R, Dammer E, Pletnikova O, i sur. Evidence for brain glucose dysregulation in Alzheimer's disease. Alzheimers Dement. 2018;14(3):318-329.

185. Cho S, Lee H, Seo J. Impact of genetic risk factors for Alzheimer's disease on brain glucose metabolism. Mol Neurobiol. 2021;58(6):2608-2619.

186. Choi H, Choi Y, Lee EJ, Kim H, Lee Y, Kwon S, i sur. Hippocampal glucose uptake as a surrogate of metabolic change of microglia in Alzheimer's disease. J Neuroinflammation. 2021;18(1):190.

187. Adamczak S, Dale G, de Rivero Vaccari JP, Bullock MR, Dietrich WD, Keane RW. Inflammasome proteins in cerebrospinal fluid of brain-injured patients as biomarkers of functional outcome: clinical article. J Neurosurg. 2012 Dec;117(6):1119-25.

188. Kerr N, García-Contreras M, Abbassi S, Mejias NH, Desousa BR, Ricordi C, i sur. Inflammasome proteins in serum and serum-derived extracellular vesicles as biomarkers of stroke. Front Mol Neurosci. 2018 Sep 4;11:309.

189. Swardfager W, Lanctôt K, Rothenburg L, Wong A, Cappell J, Herrmann N. A meta-analysis of cytokines in Alzheimer's disease. Biol Psychiatry. 2010;68(10):930-941.

190. McGeachy MJ, Cua DJ, Gaffen SL. The IL-17 family of cytokines in health and disease. Immunity. 2019;50(4):892-906.

191. Galimberti D, Schoonenboom N, Scheltens P, Fenoglio C, Bouwman F, Venturelli E, i sur. Intrathecal chemokine synthesis in mild cognitive impairment and Alzheimer disease. Arch Neurol. 2006;63(4):538-543.

192. Dufour JH, Dziejman M, Liu MT, Leung JH, Lane TE, Luster AD. IFN-gamma-inducible protein 10 (IP-10; CXCL10)-deficient mice reveal a role for IP-10 in effector T cell generation and trafficking. J Immunol. 2002;168(7):3195-3204.

11. ŽIVOTOPIS

Ena Španić Popovački rođena je 21. ožujka 1994. godine u Karlovcu gdje je završila opći smjer Gimnazije Karlovac 2013. godine. Diplomirala je 2018. godine na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu te stekla naziv magistre eksperimentalne biologije. Iste godine dobila je pohvalnicu Prirodoslovno-matematičkog fakulteta za izuzetan uspjeh u studiju. Poslijediplomski doktorski studij Neuroznanost upisuje 2019. godine na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu te počinje s izradom disertacije pod mentorstvom prof. dr. sc. Gorana Šimića. Od iste godine zaposlena je na Hrvatskom institutu za istraživanje mozga Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu temeljem projekta HRZZ-a "Razvoj karijera mladih istraživača". Položila je LabAnim tečaj za osposobljavanje za rad s laboratorijskim životinjama 2019. godine. Članica je Hrvatskog društva za neuroznanost, Federation of European Neuroscience Societies (FENS), Mediterranean Neuroscience Society te ALBA network-a. Do sada je autor na šest znanstvenih radova, pet kongresnih priopćenja te jednog poglavlja knjige.