

UNIVERZITET U BEOGRADU
MEDICINSKI FAKULTET

Nela S. Maksimović

ANALIZA POLIMORFIZAMA GENA ZA
APOE, BDNF, BCHE I KIBRA I NJIHOVA
KORELACIJA SA MEMORIJSKIM
SPOSOBNOSTIMA U POPULACIJI
STUDENATA

DOKTORSKA DISERTACIJA

Beograd, 2014

Mentor: **Prof. dr Ivana Novaković**

Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

Članovi komisije za odbranu doktorske disertacije:

1. Prof. dr Ljiljana Luković

Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

2. Prof. dr Elka Stefanova

Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

3. Doc. dr Branka Popović

Stomatološki fakultet Univerziteta u Beogradu

Zahvaljujem:

Mojoj mentorki, *profesorki dr Ivani Novaković*, na ukazanom poverenju, na velikoj i nesebičnoj stručnoj pomoći i razumevanju tokom izvođenja molekularno-genetičkih analiza, obrade rezultata, pisanja i finalnog oblikovanja rada;

Profesorki dr Elki Stefanovoj na velikoj pomoći i podršci prilikom sprovođenja ovog istraživanja;

Osoblju Instituta za humanu genetiku Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu na savetima i stručnoj pomoći u laboratorijskom radu;

Profesorki dr Jeleni Marinković na dragocenim sugestijama i statističkoj obradi rezultata;

Beskrajno, *svojoj porodici* na razumevanju, strpljenju i podršci

SAŽETAK

Memorija predstavlja sposobnost privremenog ili trajnog skladištenja i prizivanja informacija stečenih iskustvom ili aktivnim učenjem i ima multifaktorsku osnovu. Procenjuje se da heritabilnost memorijskih sposobnosti iznosi oko 50% što ukazuje na značajan uticaj genetske osnove na individualnu varijabilnost u memorijskim sposobnostima. U ovom radu analizirali smo polimorfizme: rs6265 u genu za moždani faktor rasta (BDNF), rs7412/rs429358 u genu za apolipoprotein E (APOE), rs1803274 u genu za butirilholin esterazu (BCHE) i rs17070145 u genu za protein KIBRA. Cilj istraživanja bio je da utvrdimo učestalost odgovarajućih genotipova i alela, analiziramo da li postoji statistički značajna povezanost utvrđenih genotipova sa podacima dobijenim iz upitnika (demografski i socioekonomski podaci, uspeh tokom školovanja) i analiziramo da li postoji statistički značajna povezanost genotipova sa rezultatima testova opštih kognitivnih sposobnosti, pažnje, radne i epizodičke memorije. Studija je obuhvatila ukupno 560 studenata Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu. Za detekciju genskih polimorfizama u APOE, BDNF i BCHE genu primenili smo PCR-RFLPs metodu. Detekcija genotipova polimorfizma u genu za protein KIBRA izvršena je primenom standardizovanog TaqMan SNP Genotyping eseja. Baterija neuropsiholoških testova obuhvatila je Raven-ove standardne progresivne matrice, test ponavljanja cifara, Rey-ov test auditivno-verbalnog učenja, i Vekslerovu revidiranu skalu pamćenja-subtest logičke memorije. Dobijeni rezultati pokazali su da nosioci A alela (tj. K varijante) BCHE rs1803274 polimorfizma postižu značajno bolje rezultate na testu pažnje/radne memorije ($p=0.019$). Takođe, uočeno je i da nosioci A alela (tj. Met alela na nivou proteina) BDNF polimorfizma rs6265 postižu značajno bolje rezultate na subtestu logičke memorije ($p=0.039$). Nije uočena asocijacija BCHE i BDNF polimorfizma sa drugim tipovima memorije kao ni sa podacima dobijenim iz upitnika. Analiza polimorfizama u KIBRA i APOE genu nije pokazala statistički značajnu povezanost sa rezultatima ostvarenim na testovima memorijskih sposobnosti, niti uspehom ostvarenim tokom školovanja.

Ključne reči: polimorfizmi gena, APOE, KIBRA, BDNF, BCHE, epizodička memorija, pažnja, radna memorija, opšte kognitivne sposobnosti

Naučna oblast: medicina; **uža naučna oblast:** molekularna medicina

Analysis of polymorphisms in APOE, BDNF, BCHE and KIBRA genes and their correlation with memory performance in the population of students

ABSTRACT

Human memory represents the capability of temporary or permanent storage and retrieval of informations. Memory is multifactorial trait with heritability around 50%. High heritability shows the importance of genetic basis of individual differences in memory performance. In our research we analysed rs6265 polymorphism in gene encoding brain derived neurotrophic factor (BDNF), rs7412/rs1803274 in gene coding for apolipoprotein E (APOE), rs1803274 in butyrylcholinesterase (BCHE) gene and rs17070145 in the gene coding for KIBRA protein. The aim of our research was to detect the frequency of genotypes and alleles of analysed polymorphisms, to analyse the association between genotypes and demographic and socioeconomic data obtained from the questionnaire and to analyse the association between genotypes and results of battery of neuropsychological tests. Our study included population of 560 students of Faculty of Medicine, University of Belgrade. For detection of APOE, BDNF and BCHE polymorphism genotypes we used PCR/RFLPs method and for KIBRA polymorphism TaqMan SNP Genotyping assay. Battery of neuropsychological test included Raven standard progressive matrices, Digit ordering test, Rey auditory verbal learning test and Wechsler revised subtest of logical memory. Our results showed that there was no correlation between genotypes of analysed polymorphisms and demographic and socioeconomic data. Carriers of A allele (or K variant) of BCHE rs1803274 polymorphism achieved significantly better results on Digit ordering test ($p=0.019$) while carriers of A allele (or Met allele on protein level) of BDNF rs6265 polymorphism had significantly better results on Wechsler's subtest of logical memory ($p=0.039$). We found no association between APOE and KIBRA polymorphism and memory performance or results obtained from the questionnaire.

Key words: gene polymorphism, APOE, KIBRA, BDNF, BCHE, episodic memory, attention, working memory

scientific area: medicine; **narrow area of expertise:** molecular medicine

SADRŽAJ

UVOD	1
1. MEMORIJA	1
1.1. Faktori koji utiču na memorijske sposobnosti	9
2. GENETIČKI FAKTORI KOJI UTIČU NA MEMORIJSKE SPOSOBNOSTI	12
2.1. Poligenska osnova memorijskih sposobnosti	12
2.1.1. Polimorfizmi DNK- genski polimorfizmi	12
2.1.2. Tipovi polimorfizama i mehanizam njihovog nastanka	13
2.1.3. Primena DNK polimorfizama u identifikaciji gena odgovornih za poligenska svojstva kod čoveka	15
3. MOŽDANI FAKTOR RASTA (BDNF)	20
3.1. Struktura BDNF gena i proteina	20
3.2. Polimorfizmi gena za BDNF	22
3.3. Funkcija BDNF-a	24
4. KIBRA	29
4.1. Struktura gena i proteina	29
4.2. Polimorfizam u genu za KIBRA protein	30
4.3. Funkcija KIBRA proteina	30
5. APOLIPOPROTEIN E (APOE)	35
5.1. Struktura gena i proteina	35
5.2. Polimorfizmi APOE gena	36
5.3. Funkcija APOE proteina	37
5.4. Uloga APOE u memorijskim procesima	40
5.5. Uloga APOE u Alchajmerovoj bolesti	41
6. BUTIRILHOLIN ESTERAZA - BCHE	45
6.1. Struktura gena i proteina	45
6.2. Polimorfizmi BCHE gena	46
6.3. Funkcija BChE	48
6.4. Uloga BChE u Alchajmerovoj bolesti	50
CILJEVI RADA	52
ISPITANICI I METODE	53
7. ISPITANICI	53
8. METODE MOLEKULARNO-GENETIČKE ANALIZE	54
8.1. Izolacija DNK iz limfocita periferne krvi	54

8.2.	PCR metoda i restrikciona digestija PCR produkata (PCR-RFLPs metoda)	55
8.2.1.	Analiza polimorfizma G196A (rs6265) gena za BDNF	56
8.2.2.	Analiza polimorfizama 128/158 (rs7412/rs429358) gena za APOE	58
8.2.3.	Analiza polimorfizma rs1803274 gena za BCHE	60
8.3.	PCR u realnom vremenu (Real Time PCR)	61
8.3.1.	Analiza polimorfizma rs 17070145 gena za KIBRA protein	63
9.	NEUROPSIHOLOŠKA BATERIJA TESTOVA	64
10.	STATISTIČKE METODE	66
	REZULTATI	67
11.	Analiza podataka dobijenih iz upitnika	67
12.	Analiza rezultata testova opštih kognitivnih i memorijskih sposobnosti	70
12.1.	Rezultati molekularno-genetičkih analiza – BDNF rs6265 genotip	71
12.2.	Rezultati molekularno-genetičkih analiza-KIBRA rs17070145 genotip	78
12.3.	Rezultati molekularno-genetičkih analiza APOE genotip rs7412/rs429358	90
12.4.	Rezultati genetičkih analiza-BCHE rs1803274 genotip	97
	DISKUSIJA	110
13.	Analiza BDNF Val66Met polimorfizma u populaciji studenata	112
14.	Analiza KIBRA polimorfizma u populaciji studenata	117
15.	Analiza APOE polimorfizama u populaciji studenata	121
16.	Analiza BCHE polimorfizma u populaciji studenata	127
	ZAKLJUČAK	131
	LITERATURA	134

UVOD

1. MEMORIJA

Memorija je osnovni dinamični kognitivni sistem koji predstavlja sposobnost privremenog ili trajnog skladištenja i prizivanja informacija stečenih iskustvom ili aktivnim učenjem. To je fundamentalna kognitivna sposobnost koja ljudskom životu daje smisao, kontinuitet i kontekst (1). Važno je napomenuti da se u srpskom jeziku pored pojma memorija koristi i pojam pamćenje. Neki autori prave razliku između ova dva pojma. Po njima, pojam pamćenja obuhvata proces zapamćivanja-učenja, prisećanja-izvlačenja sadržaja memorije, proces autobiografskog sećanja itd., dok se terminom memorija označavaju strukturni aspekti funkcije pamćenja. Ova pojmovna dihotomija nije načelna jer je razmatranje procesa pamćenja odvojeno od strukture memorije praktično nemoguće pa stoga korišćenje ovih termina na predloženi način nije uvek dosledno (2).

Među istraživačima je postignut koncenzus da memoriju ne treba posmatrati kao jedan entitet već kao grupu odvojenih memorijskih sistema koji međusobno interaguju. Stiven Rous (Steven Rous) ukazuje da je nemoguće ispitati koji deo mozga je odgovoran za memoriju, jer je pamćenje vlasništvo mozga kao celine, a ne nekog određenog područja (3). Današnja saznanja o neuroanatomskim osnovama memorije zasnivaju se na rezultatima neuropsiholoških studija na pacijentima sa fokalnim lezijama mozga, neuroanatomskih studija na ljudima i životinjama, eksperimenata na životinjama, rezultata dobijenih primenom pozitronske emisije tomografije, funkcionalne magnetne rezonance i evociranih potencijala. Analiza dobijenih rezultata pokazala je da funkcionisanje različitih memorijskih sistema zavisi od različitih neuroanatomskih struktura.

Dužina trajanja informacije uskladištene u memorijskim sistemima varira u rasponu od delova sekunde do životnog veka a kapacitet, kako se čini može prevazilaziti i najmoćnije danas napravljene računare. Savremena psihologija pravi razliku između psihološki i neurofiziološki različitih tipova pamćenja u odnosu na dužinu čuvanja informacija u pojedinim memorijskim sistemima (grafikon 1.):

- **Senzorno pamćenje** - traje samo onoliko koliko i senzorni procesi prilikom doživljavanja sadržaja, sastavni je deo procesa opažanja
- **Kratkotrajno pamćenje** - traje nešto duže - do nekoliko minuta, služi za brzo kodiranje i selekciju informacija, ograničenog je kapaciteta i
- **Dugotrajno pamćenje** - trajno ili bar relativno trajno, neograničenog kapaciteta, predstavlja skladište informacija povezanih u sistem uglavnom po smislu ili značenju.

Senzorno pamćenje

Informacije iz spoljašnje sredine najpre stižu u skladišta senzornog pamćenja (vidnog - ikoničkog, slušnog – ehoičkog, taktalnog - haptičkog pamćenja), gde se zadržavaju svega nekoliko milisekundi. U vizuelnom modalitetu informacija se zadržava oko 250 msec., a u akustičkom oko 2 sec. pa se ova komponenta pamćenja naziva još i ultrakratkoročnim pamćenjem (4). Ispoljava se kao postojanje kratke naknadne slike, zvuka ili nekog drugog osećaja (ukus, miris, dodir) nakon što je draž već prestala da deluje na odgovarajuće čulo (2). Senzorna memorija predstavlja jednu od raskrsnica, budući da se informacija ili gubi ili u zavisnosti od važnosti prenosi u kratkoročno pamćenje. S obzirom na to da se senzorno pamćenje brzo gasi, interval u kome se informacija mora prepoznati, klasifikovati i odrediti joj smisao da ne bi zauvek bila izgubljena je izuzetno kratak. Ovaj vid pamćenja najbrže i najlakše prelazi u zaboravljanje i samo mali deo memorisanog sadržaja prelazi u kratkotrajno pamćenje.

Kratkoročno (kratkotrajno) pamćenje

U kratkoročnom pamćenju informacija se zadržava 30-45 sekundi, nakon čega se ili gubi ili prenosi u dugoročno pamćenje i tamo pretvara u trajni memorijski zapis. Od naročite je važnosti istaći činjenicu da od ponavljanja primljenih informacija zavisi da li će se sadržaj izgubiti (zaboraviti) ili trajno zadržati u pamćenju. Ponavljanje mora biti na "dubinski" i smislen način jer pasivno ponavljanje ne dovodi do dugoročnog upamćivanja. Što su složenije intelektualne operacije kojima se informacije u

kratkoročnom pamćenju obrađuju, to će te informacije biti bolje zapamćene u dugoročnom pamćenju.

Kratkoročno pamćenje izvršava sledeće funkcije:

1. Kratko zadržava sadržaje koji su nam potrebni u nepromenjenom obliku;
2. Omogućava kodiranje sadržaja za uspešno čuvanje na duži rok;
3. Omogućava vraćanje sadržaja iz dugoročnog pamćenja sačuvanog na duži rok, pomoću pronalaženja i prisećanja (5).

Radna memorija

Još uvek nema opšte saglasnosti među autorima kada je u pitanju definicija radne memorije. Jedni je poistovećuju sa kratkoročnom memorijom (6,7) dok drugi autori odvajaju ova dva pojma (8). Radna memorija predstavlja sistem za privremeno zadržavanje i manipulaciju informacijom, koji učestvuje u izvođenju niza različitih, vrlo važnih kognitivnih zadataka, poput učenja, rezonovanja i razumevanja. Radna memorija ima ograničen kapacitet i kratko trajanje (nekoliko minuta) i odnosi se na održavanje i manipulisanje informacijama koje se nalaze u fokusu pažnje, kao i na sadržaje za koje je neophodno da se zna njihov trenutni status radi donošenja odluke (9). Brojne studije su pokazale da radna memorija koristi mrežu kortikalnih i subkortikalnih regiona u zavisnosti od tipa zadatka (10). Tako fonološki zadaci uključuju više regione leve strane mozga dok prostorna radna memorija u većoj meri uključuje regione desne strane mozga (11). Takođe, pokazano je da teži zadaci zahtevaju bilateralnu aktivaciju mozga bez obzira na prirodu materijala kojim se manipuliše (12). Šta više, sa povećanjem složenosti zadatka povećava se i broj aktiviranih regiona u prefrontalnom korteksu (13).

Dugoročno (dugotrajno) pamćenje

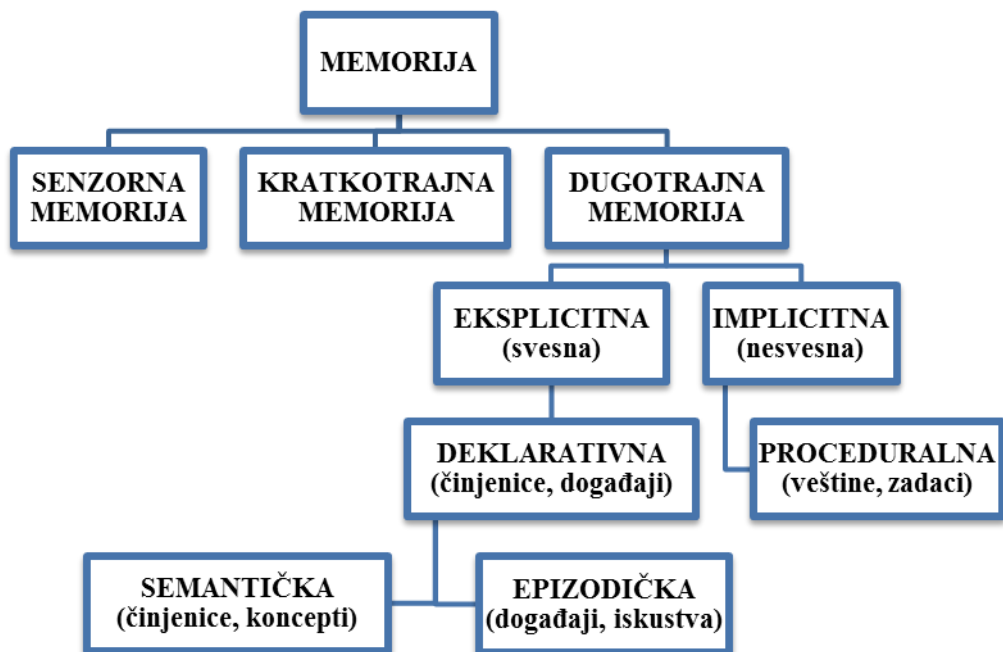
Dugoročno pamćenje, često nazvano sekundarnom memorijom (14) obuhvata kodiranje, konsolidaciju, skladištenje i prizivanje sadržaja i traje od 45 sec. pa nadalje,

godinama, decenijama odnosno ceo život. U dugoročnom pamćenju sadržaji se trajno zadržavaju u ovom sistemu koji je neograničenog kapaciteta (3). Najšira podela dugoročnog pamćenja izvršena je na skorašnje, u kome se informacije zadržavaju nekoliko minuta i davnašnje dugotrajno pamćenje, koje obuhvata stečena iskustva i znanja tokom čitavog života.

Proces dugotrajnog pamćenja se odvija kroz tri stadijuma:

- *upamćivanje* koji se odnosi na unošenje u skladište, odnosno, sticanje, kodiranje, stvaranje zapisa (tragovi pamćenja, engram=memorijski zapis)
- *pamćenje*, čuvanje u skladištu, odnosno *retencija*.
- *prisećanje*, odnosno, aktivacija tj. dekodiranje engrama (15). Prizivanje informacija može biti putem prepoznavanja (rekognicije) upamćenih sadržaja u trenutku njegovog ponovnog izlaganja i putem slobodnog prisećanja prethodno naučenog materijala (3). Ovi procesi se nadovezuju, odnosno odvijaju se paralelno i u međuzavisnosti su sa kratkoročnim pamćenjem (16).

Grafikon 1. Podela memorijskih sistema



Druga podela zasniva se na tome da li se mi svesno sećamo informacija-činjenica i događaja ili pak pamćenje nije dostupno našoj svesti.

EksPLICITNO pamćenje stiče se svesnim naporom i nazvano je *deklarativnim* jer se stečena znanja mogu iskazati rečju, pismom ili nekim drugim simboličkim sredstvom i odnosi se na sve informacije koje su dostupne našem svesnom prisećanju. (17). EksPLICITNO pamćenje u kome su sačuvani životni događaji i za njih vezane životne uspomene nazvano je pamćenjem epizoda, odnosno, epizodičko pamćenje (18).

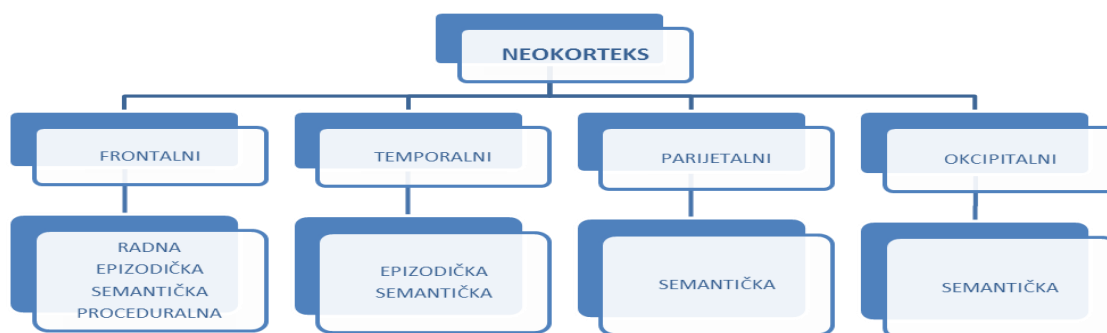
Epizodičko pamćenje je značajan neurokognitivni sistem koji omogućava svesno prisećanje prošlih događaja (autobiografskih događaja, naučenog materijala) u kontekstu prostora i vremena. Epizodička memorija je pod kontrolom široke mreže kortikalnih i subkortikalnih regiona mozga, jedinstvena u odnosu na druge tipove memorije i najverovatnije specifična samo za ljudski rod. Utvrđeno je da funkcionisanje epizodičke memorije zavisi od medijalnog temporalnog režnja (19). Strukture medijalnog temporalnog režnja bitne su za uspostavljanje dugoročnog eksplicitnog pamćenja, ali nisu skladište tog pamćenja. Ove strukture potrebne su za učenje i postupno upamćivanje naučenog, ali jednom učvršćeno trajno pamćenje sačuvano je najverovatnije u neokortikalnim područjima moždane kore. Hipokampusna formacija, po mnogim istraživanjima, predstavlja deo medijalnog temporalnog lobusa koji je najvažniji za memorijske procese. Corpus amigdalioideum tj. amigdala (amigdaloidni kompleks) zauzima sledeće mesto po važnosti naročito kada su u pitanju asocijativna i emocionalna memorija. Najnovija istraživanja ukazuju na činjenicu da važnu ulogu u identifikaciji stimulusa i memoriji ima i rinalni korteks. Studije su pokazale da sistem epizodičke memorije uključuje i frontalne lobuse (20,21) koji imaju ulogu u primanju, obradi i kodiranju informacija (22), sećanju na izvor informacija, prisećanju bez navođenja (23) i prisećanju vremenskog sleda događaja (24). Takođe, pokazano je da su levi medijalni temporalni i levi frontalni lobus aktivni prilikom učenja reči dok je desni medijalni temporalni i desni frontalni lobus aktivan prilikom pamćenja vizuelnih scena. Značaj frontalnih lobusa potiče od činjenice da oni omogućavaju osobi da se fokusira na informaciju koju treba da zapamti i da aktivira temporalne lobuse.

Semantičko pamćenje (značenjsko pamćenje) je kao i epizodičko pamćenje deklarativni, eksplicitni memorijski sistem čiji je centar u inferolateralnim temporalnim lobusima. Predstavlja onaj deo eksplicitnog pamćenja koji se tiče pojmova i simbola i odnosi na osnovne informacije, činjenice i pravila koja su neophodna za njihovu upotrebu. To su gramatička pravila, matematičke formule, iskazi koji označavaju različite zakonitosti i slično. Najčešće, poremećaj semantičke memorije posledica je Alchajmerove bolesti usled promena u inferolateralnim temporalnim lobusima i frontalnom korteksu što dovodi do slabe aktivacije ovih regiona mozga i slabog prisećanja semantičkih informacija (25). Važno je istaći da se u Alchajmerovoj bolesti propadanje epizodičke i semantičke memorije odvija nezavisno što ukazuje da su u pitanju dva odvojena memorijska sistema (26). U tabeli 1. prikazani su i drugi poremećaji koji se odlikuju promenama u različitim memorijskim sistemima.

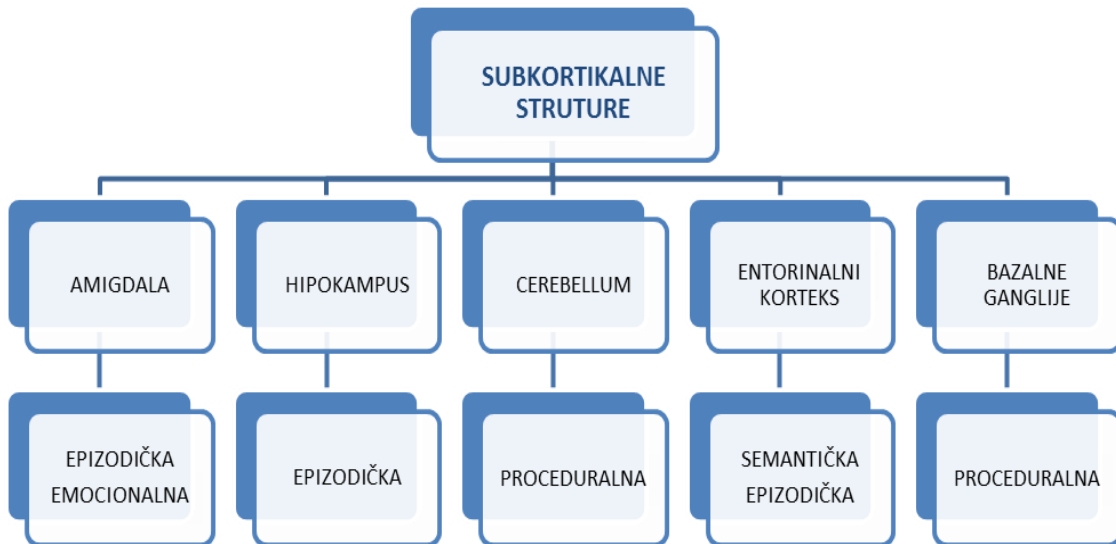
Implicitno pamćenje obuhvata mnoga znanja i veštine stečene tokom života kojih nismo svesni, odnosno ne znamo kako je do tih znanja došlo. Ovaj vid pamćenja sastoji se u pamćenju postupaka ili procedura, načina kako se neka radnja obavlja da bi se postigao određeni cilj. **Proceduralna memorija** odnosi se na učenje i sticanje senzornih veština, kao što su hodanje, skijanje, vožnje automobila ali sadrži i kognitivne veštine: poznavanje pravila igranja šaha, izvođenje računskih operacija i dr. Primenom metoda funkcionalnog imidžinga zapaženo je da se prilikom učenja novog zadatka aktiviraju bazalne ganglije i cerebellum (27). Dokazi koji podržavaju ovo otkriće su da lezije bazalnih ganglija i cerebeluma dovode do narušavanja sposobnosti učenja proceduralnih veština (28).

Na grafikonima 2. i 3. prikazane su anatomske strukture neokorteksa i subkortikalnih regiona odgovorne za funkcije različitih tipova memorijskih sistema.

Grafikon 2. Strukture neokorteksa značajne za memorijske funkcije



Grafikon 3. Subkortikalne strukture značajne za memorijske funkcije



Podela na **senzorno** i **motorno** pamćenje izvršena je prema mnestičkom materijalu, a u odnosu na senzorni kanal pamćenje može biti: **vizuelno** (slike, boje, oblici), **auditivno** (govor, tonovi, zvukovi...), **olfaktorno** (mirisi), **gustativno** (ukusi) i **taktilno** (dodir, bol).

U odnosu na vrstu informacija koje se pamte pamćenje se deli na: **verbalno** – reči, imena, informacije zabeležene rečima i **neverbalno** – slike, prostorni rasporedi, geografske lokacije, melodije.

Takođe postoji i podela pamćenja na **anterogradno**-sposobnost učenja novih informacija i **retrogradno** koje se odnosi na prizivanje ranije uskladištenih informacija.

Tabela 1. Poremećaji koji se odlikuju i promenama u memorijskim sposobnostima

Epizodička memorija	Semantička memorija	Proceduralna memorija	Radna memorija
Alchajmerova bolest	Alchajmerova bolest	Parkinsonova bolest	Vaskularna demencija
Blagi kognitivni poremećaj	Semantička demencija	Hantingtonova bolest	Frontalna varijanta frontotemporalnih demencija
Demencija sa Luijevlim telima	Traumatske povrede mozga	Progresivna supranuklearna paraliza	Alchajmerova bolest
Encefalitis (herpes simplex)	Encefalitis (najčešće herpes simplex)	Olivopontocerebelarna degeneracija	Demencija sa Luijevlim telima
Frontalna varijanta frontotemporalnih demencija		Depresija	Multipla skleroza
Korsakovljev sindrom		Opsesivno-kompulsivni poremećaj	Traumatske povrede mozga
Privremena globalna amnezija			Neželjeni efekti lekova
Kontuzija mozga			ADHD
Traumatske povrede mozga			Opsesivno-kompulsivni poremećaj
Epi napadi			Shizofrenija
Hipoksična-ishemijska povreda			Parkinsonova bolest
Neželjeni efekti lekova			Progresivna supranuklearna paraliza
Deficijencija vitamina B ₁₂			Kardiopulmonarni bajpas
Hipoglikemija			Deficijencija vitamina B ₁₂
Anksioznost			
Hirurgija temporalnih lobusa			
Vaskularna demencija			
Multipla skleroza			

1.1. Faktori koji utiču na memorijske sposobnosti

Brojne bihevioralne, genetičke i eksperimentalne studije ukazuju na kompleksnost memorijskih sistema koja potiče od sadejstva različitih faktora. Do danas, identifikovani su brojni demografski, socioekonomski i psihološki faktori koji dovode do individualnih razlika u memorijskim sposobnostima ljudi. Ipak, njihov uticaj je još uvek nedovoljno razjašnjen.

Demografski faktori koji utiču na individualne razlike u memorijskim sposobnostima su:

Starenje –Napredak u medicini, farmakologiji, genetici, javnom zdravlju, promovisanju zdravih stilova života ukazuje da će se životni vek produžavati, a populacija starih se povećavati. Tako projekcije za 2050. predviđaju da će u svetu udeo starijih od 65 godina biti 16,2%, a u razvijenim zemljama 25,7% (29). Populacija starih se u svetu sve više deli na tri podgrupe: "mlado staro" stanovništvo (young old) od 65 do 74 godine, staro stanovništvo od 75 do 84 godine, i "najstarije staro" stanovništvo (oldest old) preko 85 godina (30). Iako većina starih osoba ne razvije demenciju, u odmaklim godinama dolazi do određenog stepena kognitivnog propadanja. Na osnovu studija sprovedenih na starijim osobama koje nemaju demenciju došlo se do zaključka da različite komponente memorijskog sistema ne stare istom brzinom tj. da pokazuju različitu osetljivost na procese starenja. Mnoge starije osobe žale se na poteškoće u prisećanju ličnih imena, imena predmeta i dr. Uprkos subjektivnim žalbama semantička memorija je među stabilnijim komponentama memorijskog sistema. Semantička memorija pokazuje vrlo slab pad, čak je pokazano da semantičko znanje i memorija rastu do šeste-sedme decenije života nakon čega sledi postepeno slabo opadanje u njihovoj funkciji.

Uticaj starenja na proceduralnu memoriju je znatno manje izučavan ali postoji konsenzus među naučnicima da starije osobe imaju trajno očuvanu proceduralnu memoriju. Ono što se menja sa godinama jeste brzina kojom mogu da izvrše određene radnje.

Za razliku od semantičke memorije epizodička memorija značajno slabi sa godinama. Takođe, sve je više dokaza da i radna memorija značajno opada sa godinama. Smatra se da je upravo pad u funkcionisanju radne memorije uzrok

propadanja drugih kognitivnih sposobnosti. Uočeno je da se performanse radne i epizodičke memorije smanjuju linearno još od dvadesetih godina i blagi pad se nastavlja tokom celog života. Brojne studije ukazuju na značajan pad u memorijskim sposobnostima epizodičke i radne memorije nakon šezdesete godine života (31).

Pol – Utvrđeno je da postoji razlika među polovima u epizodičkoj memoriji i da žene postižu bolje rezultate na neuropsihološkim testovima (32). Razlike među polovima u drugim tipovima memorije nisu uočene ili su pak dobijeni rezultati kontradiktorni.

Socioekonomski faktori za koje je poznato da utiču na memorijske sposobnosti su:

Nivo obrazovanja – Ovaj parametar obično je izražen kroz godine formalnog obrazovanja. Pokazano je da nivo obrazovanja utiče na memorijske sposobnosti i u mlađem i u starijem životnom dobu (33). Nekoliko studija je pokazalo da nivo obrazovanja utiče na rezultate testova semantičke memorije ali da ima vrlo malo uticaja na epizodičku memoriju (34). Uslovi života su pokazali značajnu korelaciju sa memorijskim sposobnostima samo u kombinaciji sa nivoom obrazovanja.

Životni stil - Uočena je pozitivna asocijacija memorijskih sposobnosti sa socijalnim angažovanjem, kognitivnim i fizičkim aktivnostima kao i sa intelektualno stimulativnim aktivnostima i na svim uzrastima (35).

Psihološki faktori za koje je potvrđeno da utiču na memorijske sposobnosti su:

Pažnja – Pažnja označava usmeravanje psihičke i psihomotoričke aktivnosti prema određenim sadržajima. Kroz modernu istoriju psihologije i neuronauka, pažnja i memorija zauzimaju centralno mesto kao fundamentalni procesi u kognitivnim (intelektualnim) funkcijama. Ipak, najveći broj istraživanja je usmeren na ove procese kao zasebne jedinice. Studije memorije nisu ispitivale ulogu pažnje u modulaciji i kodiranju memorije, dok su studije pažnje zanemarivale prošlo iskustvo i znanje (36). Pažnja i memorija ne mogu funkcionisati jedna bez druge. Kratkotrajna memorija ima ograničen kapacitet i pažnja vrši selekciju materijala koji će biti upamćen (37). Podela pažnje tokom procesa kodiranja sprečava formiranje svesne memorije. Informacije mogu biti upamćene i kada postoji konkurentni zadatak ali tada stimulus koji treba da

bude kodiran (zapamćen) mora biti izabran među ostalim stimulusima. Iako se obično smatra da pažnja utiče na memoriju, sve više je dokaza da prisećanje prošlih doživljaja utiče na to na koje od postojećih stimulusa treba obratiti pažnju (36). Regioni mozga koji su značajni za memoriju, kao što su hipokampus i medijalni temporalni režanj su takođe aktivni u procesu pažnje što govori u prilog tome da se memorija i pažnja moraju zajedno proučavati.

Motivacija – Ovaj faktor utiče na memorijske sposobnosti prilikom procesa kodiranja tj. utiče na aktivnu fazu pamćenja ali ne utiče na proces prisećanja. Razlikujemo spoljašnju (ekstrinzičku) i unutrašnju (intrinzičku) motivaciju. Spoljašnja motivacija se odnosi na sve one motive koji nisu vezani direktno za sadržaj koji se pamti. Tu ubrajamo lične motive koji imaju za cilj da povećaju ili istaknu vrednosti sopstvene ličnosti kako u očima drugih tako i u sopstvenim očima, kao što su: želja za uspehom, strah od neuspeha, podsticaji (takmičenja, nagrade, kazne, pohvale i pokude), motiv postignuća. Sa druge strane unutrašnja (intrinzička) motivacija se zasniva na interesovanju za materiju koja se pamti. Pokazano je da motivacija znatno utiče na uspeh prilikom rešavanja neurokognitivnih testova na osnovu kojih sudimo o nečijim memorijskim sposobnostima (38).

Emocionalno stanje - Do skora emocije nisu uzimane u obzir prilikom analize i razumevanja kognitivnih sposobnosti kao što je memorija. Ipak, postalo je jasno da ne možemo isključiti uticaj emocija koje su retko kada odsutne iz naših svakodnevnih aktivnosti. Primećeno je da se događaji koji su praćeni jakim emocijama bolje pamte. Interakcija emocija i pamćenja potiče od uticaja amigdale na procese obrade informacija koji zavise od funkcije hipokampusu i prefrontalnog korteksa, od kodiranja i skladištenja informacija pa do prisećanja (39).

2. GENETIČKI FAKTORI KOJI UTIČU NA MEMORIJSKE SPOSOBNOSTI

2.1 Poligenška osnova memorijskih sposobnosti

Kao što je već spomenuto, memorijske sposobnosti ljudi imaju poligenšku, tj. multifaktorsku osnovu. To znači da na njihovo ispoljavanje utiču kako genetički faktori tako i faktori sredine. Relativni udeo genetičkih faktora u ispoljavanju određene osobine naziva se heritabilnost. Na osnovu dosadašnjih studija procenjeno je da heritabilnost memorijskih sposobnosti iznosi oko 50% što ukazuje na značajan uticaj genetske osnove na individualnu varijabilnost u memorijskim sposobnostima (40). Heritabilnost kompleksnih osobina kao što je memorija zavisi od varijacija u velikom broju gena sa relativno malim pojedinačnim aditivnim uticajem. Pitanje koje se postavlja je kako i koje varijacije u našim genima utiču na individualne razlike u memorijskim sposobnostima. Uprkos velikom broju sprovedenih istraživanja i primeni savremenih metoda molekularne genetike veliki deo heritabilnosti multifaktorskih osobina ostaje i dalje neobjašnjen. Ovaj fenomen označava se kao „missing heritability“ (41). U najvećem broju studija varijacije u genima analiziraju se pojedinačno, pa se u analizi ne uzimaju u obzir interakcije među genima kao što je npr. epistaza. Smatra se da bi istovremenom analizom većeg broja gena i uzimanjem u obzir interakcije među genima bio objašnjen veći procenat heritabilnosti multifaktorskih osobina pa među njima i memorije (41).

2.1.1. Polimorfizmi DNK-genski polimorfizmi

U genetici, polimorfizam je pojava dve ili više genetički određene forme (alela, varijanti, sekvenci) u populaciji s takvom učestalošću da se ni najređa među njima ne bi mogla objasniti samo novim mutacijama. Dogovoreno je da je polimorfni DNK lokus mesto na kome postoje najmanje dva alela, pri čemu najređi ima frekvenciju veću od 1%. Aleli s frekvencijama manjim od 1 % označeni su kao retke varijante. Genom čoveka se sastoji od $3,2 \times 10^9$ nukleotidnih (baznih) parova a smatra se da je u proseku bar svaki 1000. nukleotid polimorfni, tj. da se ili razlikuje između dva lokusa ili dve osobe u opštoj populaciji. Proučavanja varijabilnosti enzima i proteina pokazala su da je kod ljudi najmanje 30 % strukturnih gena (tj. gena za polipeptide) polimorfno, a da je svaka osoba heterozigotna za 10 % do 20 % svih strukturnih gena (42).

2.1.2. Tipovi polimorfizama i mehanizam njihovog nastanka

DNK polimorfizam je posledica mutacija koje se kreću u rasponu od zamene samo jedne baze do variranja u segmentu od nekoliko stotina pa i hiljada baza. Postoje tri osnovna tipa polimorfizama: polimorfizam pojedinačnih nukleotida (SNP - single nucleotide polymorphism), polimorfizam broja uzastopnih ponovaka (VNTR - variable number tandem repeats i STRPs - short tandem repeat polymorphism) i inserciono-delecioni polimorfizam.

Polimorfizam pojedinačnih nukleotida (SNP) najčešći je izvor genetičke varijabilnosti u humanom genomu i obuhvata oko 80% svih polimorfizama (43). Nastaje usled mutacija tipa supstitucije. Supstitucije jedne baze bazom istog tipa (purinska baza purinskom $G \rightarrow A$ ili $A \rightarrow G$, pirimidinska baza pirimidinskom: $C \rightarrow T$ ili $T \rightarrow C$) nazivaju se tranzicije, dok transverzije predstavljaju zamenu baze bazom drugog tipa (purin u pirimidin ili obrnuto).

Obilje podataka koji su prikupljeni poslednjih godina dovelo je do potrebe za sistematizacijom obeležavanja (nomenklature) samih polimorfizama kao i njihovih fenotipskih – funkcionalnih efekata. Za SNP-ove je uveden univerzalan način obeležavanja, u vidu takozvanog rs broja. Skraćenica „rs“ potiče od „reference SNP number“, a broj koji se dodeljuje datom polimorfizmu je jedinstven i kao takav se registruje u bazama podataka. Pored toga, zadržalo se i obeležavanje prema položaju polimorfnog – varijabilnog nukleotida u genu. Takođe, oznake koje se odnose na fenotipski efekat SNP-a, tj. njegov uticaj na strukturu proteina, se vrlo često koriste, budući da imaju veliki praktični značaj. U literaturi se sve češće upravo aminokiselinske varijante pominju kao „aleli“, što (po nama) možda nije do kraja ispravno, na primer polimorfizam rs6265 u genu za moždani faktor rasta (BDNF) vrlo često se označava kao Val66Met iako je obeležavanje G196A prema položaju varijabilnog nukleotida u genu pravilnije. Kao što je pomenuto, fenotipski efekat datog SNP-a je uvek vrlo interesantan, jer on omogućava procenu njegovog funkcionalnog efekta. Raznolikost položaja i vrste SNP-ova (unutargenski, vangenski, u kodirajućem regionu, u nekodirajućem delu gena) čini da jednostavna sistematizacija nije moguća.

Ako bazna supstitucija dovede do zamene kodona za jednu aminokiselinu kodonom za drugu u pitanju je misens ("missense") mutacija koja rezultuje sintezom izmenjenog proteina. Ukoliko se usled bazne supstitucije kodon za jednu aminokiselinu zameni stop kodonom onda je to besmislena mutacija ("nonsense" mutacija), koja za posledicu ima prekid sinteze polipeptidnog lanca. Unutar samog kodona mnogo češće se javljaju sinonimne ili tihe ("silent") mutacije koje ne dovode do promene aminokiseline. To je prevashodno zbog toga što promena aminokiseline može uticati na funkciju proteina pa je polimorfizam koji ovo uslovljava pod pojačanim selekcionim pritiskom. Sa druge strane ne znači da su "silent" mesta u kodirajućim sekvencama u potpunosti bez efekta. Alternativni tripleti koji kodiraju iste aminokiseline mogu imati različitu brzinu transkripcije, a iRNK može imati različitu brzinu translacije zbog limitiranog pula dostupnih tRNK (44). Ukoliko se polimorfizam nalazi u promotoru, intronu, 5' regulatornom regionu ili 3' regionu koji se ne prevodi (5'UTR odnosno 3'UTR) on neće direktno uticati na strukturu proteina ali može imati regulatornu ulogu. U promotorskom regionu funkcionalna posledica bilo koje tačkaste mutacije (supstitucije ili insercije/delecije) zavisi od njene lokacije i od toga da li ona ometa interakciju odgovarajuće DNK sekvence sa određenim proteinom (transkripcionim faktorom ili RNK polimerazom). Mutacije koje ometaju ove veze imaju potencijal za menjanje ekspresionog obrasca gena što može dovesti do smanjene količine odgovarajućeg proteinskog produkta ili pak do njegove prekomerne sinteze, što takođe može imati značajne posledice. Pored toga ovaj tip mutacija može da dovede do aktiviranja gena u pogrešno vreme ili u pogrešnom tkivu.

Inserciono-delecioni polimorfizmi predstavljaju prisustvo (inserciju) ili odsustvo (deleciju) određene sekvence nukleotida u molekulu DNK. Najčešće, nukleotidna sekvenca je dužine od nekoliko do nekoliko stotina nukleotida ali su zabeležene i duplikacije od nekoliko stotina kilobaza. Inserciono-delecioni polimorfizmi su kao i SNP-ovi dialelni polimorfizmi a kroz generacije se stabilno prenose s obzirom na to da su nastali nakon jednog mutacionog događaja u evoluciji (45).

Polimorfizmi broja uzastopnih ponovaka (STRP i VNTR)

STRP označavaju varijaciju u broju ponovaka dužine 1-10bp (najčešće 2-4bp) koji se ponavljaju 10-50 puta. Ovaj tip polimorfizama identifikovan je uglavnom van gena ili u okviru introna a njihova uloga za sada nije poznata. Zbog velike raznolikosti u broju ponovaka danas se široko koriste u identifikaciji osoba putem DNK otiska tj. DNK profila .

VNTR označavaju varijaciju u broju ponovaka dužine 9-64bp, dok je ukupna dužina niza 100 do 20000bp. Predstavljaju takođe značajne markere u forenzici i utvrđivanju očinstva.

Polimorfizmi broja uzastopnih ponovaka u odnosu na SNP-ove i inserciono-delecione polimorfizme imaju značajno veću stopu mutacija i najčešće je nemoguće utvrditi izvorni, ancestralni alel.

Zastupljenost i rasprostranjenost genskih alela u populaciji može da varira kako u prostoru tako i u vremenu. Decenijama evolucionari biolozi pokušavaju da razumeju evolucionarne sile koje utiču na genetičku varijabilnost. Smatra se da je kada je polimorfizam neutralan, bez uticaja na reproduktivni fitness, učestalost alela određena genetičkim driftom odnosno, slučajnošću. Učestalost neutralnih polimorfizama je relativno visoka kada je populacija velika a stopa mutacija visoka. Nasuprot tome, smatra se da aleli koji prouzrokuju smanjeni reproduktivni fitness u populaciji opstaju usled *de novo* mutacija ili imigracijom iz susednih populacija a bivaju eliminisani prirodnom selekcijom. Ipak, neophodno je još istraživanja kako bi se razumeli svi mehanizmi koji dovode do genetičke varijabilnosti humanih populacija (46).

2.1.3. Primena DNK polimorfizama u identifikaciji gena odgovornih za poligena svojstva kod čoveka

Tradicionalno, dve osnovne strategije u istraživanjima koja imaju za cilj identifikaciju gena asociranih sa poligenim tj. multifaktorskim osobinama su: studije analize vezanosti i studije asocijacije. Preduslov za uspešno sprovođenje ovakvih studija jeste postojanje visokog stepena heritabilnosti osobine koja se prati. Takođe, potrebni su i pouzdani i validni instrumenti za procenu fenotipa, kontrola drugih faktora

koji mogu uticati na fenotip (u slučaju memorije: pažnja, koncentracija, motivacija i radna memorija) i mogućnost nezavisne replikacije dobijenih rezultata.

Analiza vezanosti

U studijama analize vezanosti, analizira se vezanost genetičkih markera-polimorfnih DNK sekvenci (najčešće STRP ili VNTP) poznate lokacije na hromozomu, sa posmatranim svojstvom, obično u porodicama sa velikim brojem članova. Kao mera vezanosti posmatranog svojstva i markera koristi se LOD skor (logarithm of the odds), koji se izračunava na bazi rezultata genetičke analize, prema određenoj formuli. LOD skor jednak +3 ili veći ukazuje na visoku verovatnoću vezanosti markera i posmatranog svojstva ($>1:1000$), dok LOD skor manji od -2 ukazuje da analizirani marker i svojstvo najverovatnije nisu vezani ($<100:1$) (42). Ako se uoči da postoji vezanost markera sa osobinom koja se ispituje primenjuju se metode kao što su poziciono kloniranje, fino mapiranje i dubinsko resekvenciranje kako bi se otkrio odgovorni gen i njegove varijante. Ova strategija je bila, i još uvek je posebno pogodna za monogenske osobine i bolesti ali je takođe primenljiva i u izučavanju kompleksnih osobina. Kada je u pitanju memorija, studije analize vezanosti markera omogućile su identifikaciju varijanti gena odgovornih za poremećaje u epizodičkoj memoriji kod Alchajmerove bolesti i drugih neurodegenerativnih oboljenja (47).

Studije asocijacije

U studijama asocijacije ispituje se udruženost genskih polimorfizama sa nekim od poligenских svojstava tako što se analizira učestalost datog polimorfizma u grupi obolelih (osoba sa određenim svojstvom) i upoređuje sa podacima u zdravoj populaciji (osoba koje nemaju ispoljenu tu osobinu). Takvo istraživanje često se naziva i proučavanje „slučaj – kontrola“. Ako se učestalost u tim dvema grupama bitno razlikuje, potvrđuje se pozitivna ili negativna asocijacija.

Dve osnovne strategije koje se primenjuju u studijama asocijacije jesu analiza asocijacije gena kandidata i studije asocijacije čitavog genoma.

Studije gena kandidata

Studije gena kandidata mogu se primeniti u slučaju da postoji dovoljno znanja o biološkim mehanizmima koji su u osnovi fiziologije (u slučaju da je u pitanju oboljenje

- patofiziologije) određene osobine. Geni kandidati biraju se na osnovu saznanja dobijenih istraživanja na animalnim modelima, rezultata analize vezanosti ili na osnovu saznanja o biohemijskim procesima koji leže u osnovi osobine ili bolesti koja se ispituje. Brojne studije na životinjama, kako beskičmenjacima tako i kičmenjacima, tokom prethodne tri decenije otkrile su gene i signalne molekule značajne za memorijske procese u mozgu, uključujući protein kinaze, fosfataze, transkripcione faktore, faktore rasta i komplekse ligand-receptor (48-52). Ove studije ukazuju da su mnogi molekularni mehanizmi koji su u osnovi memorijskih sposobnosti konzervirani među vrstama. Molekuli uključeni u sinaptičku plastičnost, dugotrajnu potencijaciju, dugotrajnu depresiju i aktivnost struktura mozga kao što su hipokampus, parahipokampalni girus i amigdala mogu predstavljati idealne biološke kandidate za studije asocijacije. Iako rezultati većine studija tek treba da budu nezavisno potvrđeni, podaci ukazuju da fokusiranje na postojeće, dobro proučene biološke mehanizme vode identifikaciji gena značajnih za memorijske sposobnosti ljudi (41). Tako naprimer, pokazalo se da su za memorijske sposobnosti od značaja geni za: serotoninški receptor 2A (HTR2A), prionski protein (PRNP), prodinorfin (PDYN), dopaminski receptor (DRD2), kateholamin-0-metil transferazu (COMT) i drugi (53).

Studije asocijacije celokupnog genoma (GWAS)

Postojeća saznanja o biološkim mehanizmima značajnim za memorijske procese jasno ukazuju na gene kandidate, ali sa druge strane ograničavaju potencijal studija da identifikuju nove gene i molekularne puteve. Skorija dostignuća u razvoju metoda molekularne genetike omogućila su analizu asocijacije osobine ili bolesti sa stotinama hiljada genskih varijanti raspoređenih po celom genomu. Takve studije su poznate kao studije asocijacije celokupnog genoma (engl. Genome wide association studies, GWAS). Kompanije kao što su Affimetrix i Illumina razvile su tehnologiju mikročipova (microarray) na kojima se može analizirati po jedan SNP na svakih 5kb do čak 1kb genoma čoveka, čime se ispitivanjem obuhvata 600 000 do 3 000 000 SNP-ova. Ovakve studije sprovode se na velikom broju ispitanika a do rezultata se dolazi primenom visoko specifičnih statističkih metoda. U prvoj publikovanoj GWA studiji epizodičke memorije analizirano je 500 000 polimorfnih markera i identifikovani su polimorfizmi u dva gena, KIBRA (kidney and brain expressed protein) i CLSTN2 (calsyntenin2) koji su asociirani sa epizodičkom memorijom (54). U narednim

studijama identifikovani su još i geni za calmodulin-binding transcription activator 1 (CAMTA1) (55) i neurexin1 (NRXN1) (56). Važno je naglasiti da su geni otkriveni ovim studijama uključeni u molekularne puteve značajne za memorijske procese kao što su fosforilacija proteina, aktivacija transkripcije zavisna od kalcijuma i sinaptička plastičnost. Ipak, malo je verovatno da bi ovi geni bili izabrani *a priori* kao geni kandidati jer se vrlo malo znalo o njihovoj biološkoj relevantnosti pre studija asocijacije celokupnog genoma. To ukazuje na moćan potencijal ovog pristupa u identifikaciji novih gena i molekularnih puteva značajnih za memorijske sposobnosti.

Imidžing genetika

U asocijativnim studijama mogućnost reprodukcije dobijenih rezultata je od izuzetnog značaja. Reproducibilnost studije podrazumeva njeno ponavljanje primenom istih metoda ali od strane drugih istraživača i/ili na različitim uzorcima. Osnovni cilj replikacije jeste potvrda rezultata i zaključaka prvobitne studije pa se ovakav pristup smatra zlatnim standardom u nauci uopšte. Kada se jednom ustanovi asocijacija genskog polimorfizma sa posmatranim svojstvom, neophodno je sprovesti funkcionalna ispitivanja koja će potvrditi ovu vezu i objasniti njenu (pato)fiziološku osnovu. Što se tiče ispitivanja genetičke osnove memorije, u poslednjih nekoliko godina brain-imaging tehnike tj. metode za vizuelizaciju mozga, kao što su pozitronska emisiona tomografija (PET) i funkcionalna magnetna rezonanca (fMRI) postale su izuzetno popularne (54). Ove metode pružaju uvid u razlike aktivnosti određenih regiona mozga tokom različitih faza memorijskih procesa. Aktivnost regiona se meri praćenjem regionalnog krvotoka u mozgu. Primenom i molekularno genetičkih i imaging metoda nastala je hibridna disciplina koja se naziva „imaging genetics“ tj. imidžing genetika. Kada se uoči statistički značajna razlika u memorijskim sposobnostima u zavisnosti od genotipa, postavlja se hipoteza da će u grupi ispitanika sa boljim memorijskim sposobnostima i „povoljnim“ genotipom biti registrovana veća moždana aktivnost (57). Ukoliko se pak, suprotno očekivanju, veća moždana aktivnost registruje kod ispitanika sa rizičnim genotipom, smatra se da to ukazuje na postojanje kompenzatorne aktivnosti u mozgu (54). Interpretacija rezultata je složenija kada uprkos tome što među osobama različitih genotipova nema razlike u memorijskim sposobnostima fMRI pokazuje razliku u moždanoj aktivnosti. Moguće je da je neuronska aktivnost podložnija direktnom uticaju funkcionalnih varijanti gena pa samim tim osetljivija na efekat

različitih genotipova u poređenju sa testovima memorijskih sposobnosti. Ipak, još uvek takve rezultate treba uzimati sa rezervom (53). Potrebna su dodatna istraživanja na većem broju pacijenata kako bi sa sigurnošću tumačili dobijene rezultate. Do sada, većina „imaging genetic“ studija ispitalo je asocijaciju pojedinačnih genskih markera sa moždanom aktivnošću. Uzimajući u obzir genetsku i fenotipsku kompleksnost memorije biće potrebno istovremeno analizirati markere u većem broju gena.

Pored izučavanja polimorfizama u razumevanju genetičke osnove kompleksnih svojstava važnu ulogu imaju i jasno definisani monogeniski poremećaji koji svojim fenotipskim odlikama i molekularnim mehanizmima takođe ukazuju na moguće gene kandidate. Kada se govori o genetici memorijskih sposobnosti, dobri modeli su poznate monogenske bolesti koje uključuju i opadanje memorijskih sposobnosti. Ovde spadaju fenilketonurija (gen PHA) (58, 59, 60), sindrom fragilnog X (geni FRAX) (61), DiGeorge-ov sindrom (gen COMT) (62) i dr.

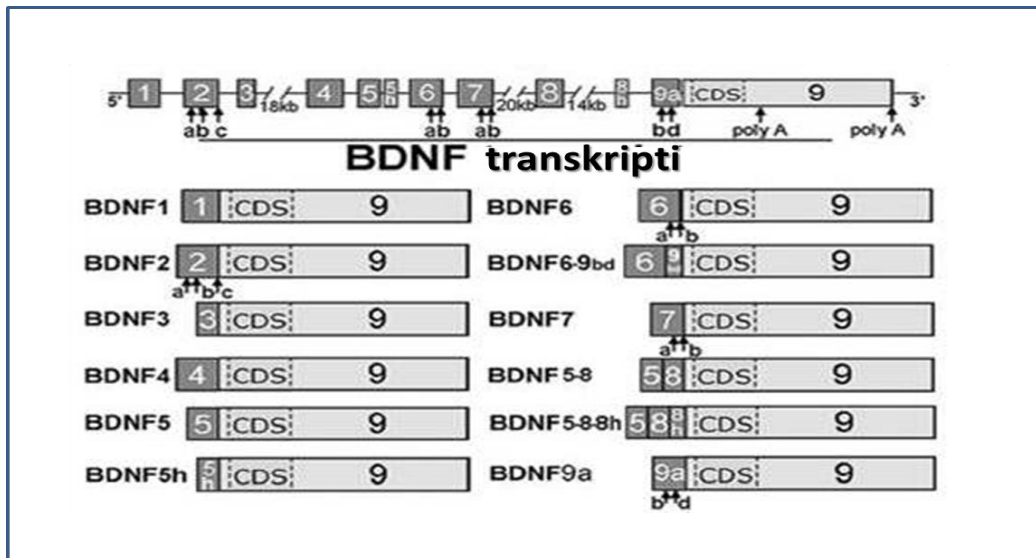
MOLEKULARNE OSNOVE PAMĆENJA

Kao što je već navedeno, poslednjih godina su prikupljeni brojni podaci o molekularnim mehanizmima pamćenja i genetičkoj kontroli memorijskih sposobnosti. Ipak, dobijeni rezultati u mnogim slučajevima nisu konzistentni i zahtevaju kritičko preispitivanje. U našoj studiji odabrali smo da analiziramo četiri gena koji reprezentuju različite aspekte i modele genetičke kontrole pamćenja: BDNF, KIBRA, APOE i BCHE.

3. MOŽDANI FAKTOR RASTA (BDNF)

3.1. Struktura BDNF gena i proteina

U naslednoj osnovi čoveka gen za BDNF (engl. Brain derived neurotrophic factor) lokalizovan je na kratkom kraku hromozoma 11, u regionu 11p.14. Gen je dužine ~70kb i sastoji se od 11 egzona od kojih je samo egzon IX (koji se nalazi na 3' kraju gena) kodirajući egzon. Egzon IX pokazuje izuzetnu kompleksnost, sastoji se od 4 regiona: a, b, c, d i podleže unutargenskom splajsovanju čime nastaju transkripti koji sadrže različite regione egzona. Do sada je otkriveno 9 različitih promotora, alternativna donorska i akceptorska mesta splajsovanja u egzonima II, V i VI i dva alternativna mesta poliadenilacije u okviru egzona IX. Alternativno splajsovanje omogućava izuzetnu heterogenost ekspresije BDNF-a u različitim tkivima i regionima mozga. Devet različitih promotora inicira transkripciju brojnih različitih transkripata iRNK. Svaki transkript se sastoji od jednog od alternativnih 5' egzona i zajedničkog 3' kodirajućeg egzona IX koji sadrži ceo otvoreni okvir čitanja za BDNF protein (63). Upotrebom alternativnih promotora, mesta splajsovanja i poliadenilacije sintetise se bar 34 različitih zrelih transkripata koji kodiraju četiri različita proteinska produkta BDNF (Slika1.).



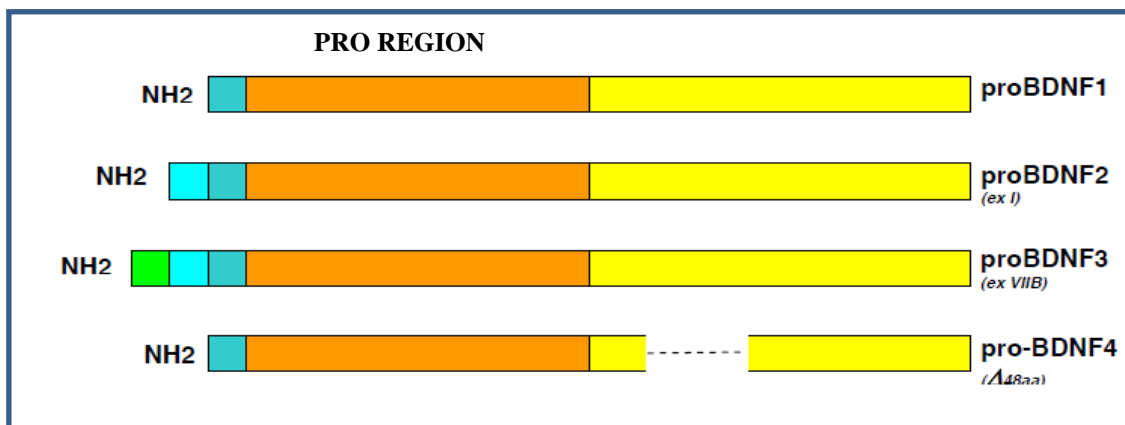
Slika 1. Struktura BDNF gena i transkripata (64)

Iako je značaj ove složene transkripcione organizacije i dalje zagonetka, jedna od hipoteza je da se kroz upotrebu alternativnih promotora, različitu stabilnost iRNK ili različitu subcelularnu lokalizaciju iRNK i proteina obezbeđuje više nivoa regulacije sinteze i funkcije BDNF-a. U korteksu promotor IV-zavisna transkripcija čini najveći deo ekspresije BDNF indukovane neuronskom aktivnošću (65). Uvođenjem knock-in mutacije u promotor IV i praćenjem ekspresije BDNF-a pokazano je da neuroni životinja formiraju manje inhibitornih sinapsi i da životinje imaju poremećaj u ekspresiji BDNF-a indukovanoj senzornim iskustvom. Takođe, uočena je smanjena ekspresija inhibitornih postsinaptičkih markera u korteksu. To ukazuje na značaj kontrole BDNF ekspresije zavisne od aktivnosti neurona u razvoju kortikalne inhibicije (65). Poliadenilacija BDNF transkripata se odvija na dva različita mesta. Time nastaju dve populacije iRNK: iRNK sa kratkim 3' UTR regionom i iRNK sa dugim 3' UTR regionom (66). Ova dva tipa iRNK se javljaju u različitim subćelijskim odeljcima neurona. Duge 3' UTR iRNK su više zastupljene u dendritima kortikalnih neurona dok su kratke 3'UTR iRNK više zastupljene u somi. Miševi bez dugih 3'UTR iRNK proizvode normalne količine iRNK i BDNF proteina u mozgu ali su dendritski trnovi njihovih CA1 piramidalnih neurona gušći i tanji a hipokampalna dugotrajna potencijacija redukovana (67). To ukazuje na značaj lokalne translacije BDNF u dendritima. Studije su pokazale da specifični UTR regioni BDNF gena služe za

usmeravanje transkripata ka dendritima gde nakon stimulacije aktivnošću neurona dolazi do lokalne translacije koja stimuliše remodelovanje dendritskih trnova u postnatalnom razvoju.

Kao i drugi članovi familije neurotrofina BDNF se sintetise u formi proBDNF od 32 kDa koja podleže N-glikozilaciji i glikosulfataciji. Pro domen dužine je 112 aminokiselina a zreli BDNF približno 149 aminokiselina.

Uprkos izuzetnoj kompleksnosti gena za BDNF do sada su otkrivene samo četiri proteinske varijante. Najviše je zastupljena proBDNF1 varijanta proteina. U odnosu na proBDNF1, proBDNF2 varijanta ima 8 aminokiselina više na N-terminusu a proBDNF3 još sedam aminokiselina više. ProBDNF4 u odnosu na ostale varijante ima deleciju 48 aminokiselina (od 154. aminokiseline do 201.) koja je posledica alternativnog splajsovanja (Slika 2.) (68). Još uvek nije poznato da li postoji razlika u lokalizaciji i funkciji ovih proteinskih varijanti.



Slika 2. Varijante BDNF proteina (68)

3.2. Polimorfizmi gena za BDNF

U genu za BDNF otkriveno je više polimorfnih mesta ali je do sada najviše izučavan polimorfizam **rs6265** koji nastaje supstitucijom guanina (G) adeninom (A) na 196-om nukleotidu i dovodi do zamene aminokiseline valina metioninom na poziciji 66 (Val66Met). Supstitucija se javlja u prodomenu, u regionu koji se kasnije iseca ali se smatra da je od velikog značaja za transport BDNF-a. Zamena valina metioninom

narušava ćelijsku obradu, transport i sekreciju BDNF-a. Studije na neurosekretornim ćelijama i primarnim neuronima u kulturi pokazale su da Met supstitucija dovodi do tri poremećaja u transportu: (1) smanjene distribucije u dendrite, (2) smanjenog pakovanja u sekretorne granule, i (3) promene u sekreciji BDNF-a (69). Primećeno je takođe da kada se u ćeliji eksprimiraju obe varijante BDNF_{Met} utiče na transport BDNF_{Val} formiranjem heterodimera koji se sa manjom efikasnošću transportuju sekretornim vezikulama. Ovaj polimorfizam je prva varijacija u genu za bilo koji neurotrofin koji je asociran sa određenom kliničkom patologijom. Do sada nije potvrđeno postojanje ovog polimorfizma kod drugih kičmenjaka. Jedna od osnovnih posledica zapaženih kod nosilaca Met alela jeste razlika u morfologiji korteksa i hipokampusa. Magnetna razonanca je pokazala da nosioci Met alela imaju manju zapreminu hipokampusa u odnosu na Val/Val homozigote (70). Smatra se da ova razlika može poticati od uloge BDNF-a u razvoju i održavanju plastičnosti mozga (71, 72, 73). Kod heterozigotnih nosilaca Met alela zapažena je i smanjena zapremina dorzolateralnog prefrontalnog korteksa, regiona značajnog za planiranje i više kognitivne funkcije kao i smanjena zapremina subkortikalnih regiona kao što su jedra kaudatuma. (74). Takođe, primećeno je da su nosioci Met alela postizali lošije rezultate na memorijskim testovima koji zavise od funkcija hipokampusa. Pozitivne i negativne asocijacije uočene su sa testovima inteligencije, drugim kognitivnim funkcijama, karakterom i memorijom, Parkinsonovom bolešću, bolestima zavisnosti, šizofrenijom, Alchajmerovom bolešću, bipolarnim poremećajem, depresijom, opsesivno-kompulsivnim poremećajem i anoreksijom.

C270T je drugi čest polimorfizam je u 5' nekodirajućem regionu introna 1 čiji efekat na ekspresiju BDNF-a još uvek nije poznat. Do sada najviše je ispitivana njegova asocijacija sa Parkinsonovom bolešću, Alchajmerovom bolešću i shizofrenijom ali potrebna su dodatna istraživanja kako bi se objasnila njegova uloga u ovim bolestima (75,76).

Polimorfizam broja ponovaka (**GT**)_n lociran u intronu 10, 1040bp uzvodno od mesta početka transkripcije. Novije studije su pokazale da je ovaj region visoko polimorfan i da ne obuhvata samo od GT ponovke već i od inserciono/delecione segmente i supstitucije nukleotida koji zajedno daju 23 različite alelne varijante. Na

neuronima pacova u kulturi pokazano je da su u pitanju funkcionalni polimorfizmi. Do sada uticaj ovih polimorfizama na kognitivne sposobnosti nije ispitivan (77).

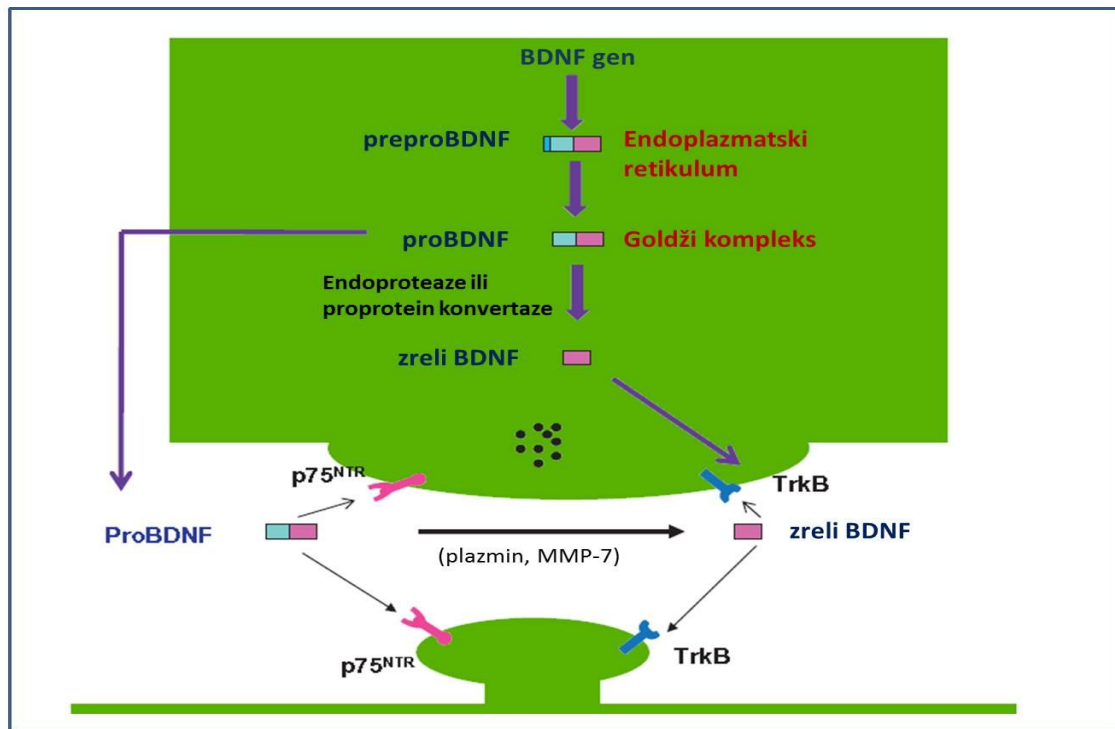
3.3. Funkcija BDNF-a

BDNF pripada familiji neurotrofina koja obuhvata još i nervni faktor rasta (NGF), neurotrofin 3 (NT3) i neurotrofin 4/5 (NT4/5). Tokom razvića, BDNF omogućava preživljavanje i diferencijaciju neurona u perifernom i centralnom nervnom sistemu, utiče na izrastanje aksona i usmeravanje njihovog rasta kao i na izrastanje i morfologiju dendrita. BDNF ima značajnu ulogu i u kasnijim fazama razvoja nervnog sistema i regulaciji sinaptičke transmisije i plastičnosti (78). Sinaptička plastičnost predstavlja selektivno jačanje i slabljenje pojedinačnih sinapsi, u zavisnosti od aktivnosti neurona što omogućava da određena informacija bude predstavljena, obrađena i sačuvana u kompleksnim neuronskim mrežama.

BDNF se eksprimira i u tkivima izvan centralnog nervnog sistema: timusu, jetri, slezini, srcu i plućima (79). Tokom razvića, ekspresija BDNF proteina je mnogo izraženija u nervnom sistemu u poređenju sa drugim tkivima i koncentracija BDNF-a u mozgu značajno raste tokom postnatalnog razvića. U nervnom sistemu adultne osobe, BDNF ima široku ekspresiju a najveća koncentracija iRNK i proteina uočena je u neuronima hipokampusa, amigdale, cerebralnog korteksa i hipotalamusa (80). Aktivnost neurona utiče na transkripciju BDNF-a, transport iRNK i proteina u dendrite i sekreciju proteina.

BDNF se inicijalno sintetise na endoplazmatičnom retikulumu kao prekursori protein (preproBDNF). Nakon sečenja signalnog peptida, proBDNF se transportuje u Goldžijev kompleks gde se raspoređuje u konstitutivne ili regulisane sekretorne vezikule. ProBDNF se konvertuje u zreli BDNF intraćelijski u trans-Goldži kompleksu pripadnicima subtilisin-keksin familije endoproteaza kao što je furin ili u nezrelim sekretornim granulama proprotein konvertazama (81). Dugo vremena se smatralo da je samo zreli sekretovani BDNF biološki aktivan a da je proBDNF isključivo lokalizovan unutar ćelija i da služi kao neaktivni prekursor. Ipak, skorija zapažanja proBDNF sekrecije i konverzije u zreli BDNF ukazuje da proBDNF može biti biološki aktivan (75). U periodu detinjstva ekspresija BDNF-a i njegovog receptora u hipokampusu

raste paralelno sa sposobnošću ovog dela regiona mozga da podleže LTP-u istovremeno sa napredovanjem sposobnosti učenja i pamćenja. Produkti BDNF gena se pakuju u vezikule, oslobađaju depolarizacijom neurona (82) i vezuju se za receptore visokog afiniteta-tirozin kinaze (posebno trkB) i receptore niskog afiniteta p75 (Slika3.) (83).



Slika 3. Obrada BDNF preproteina (68)

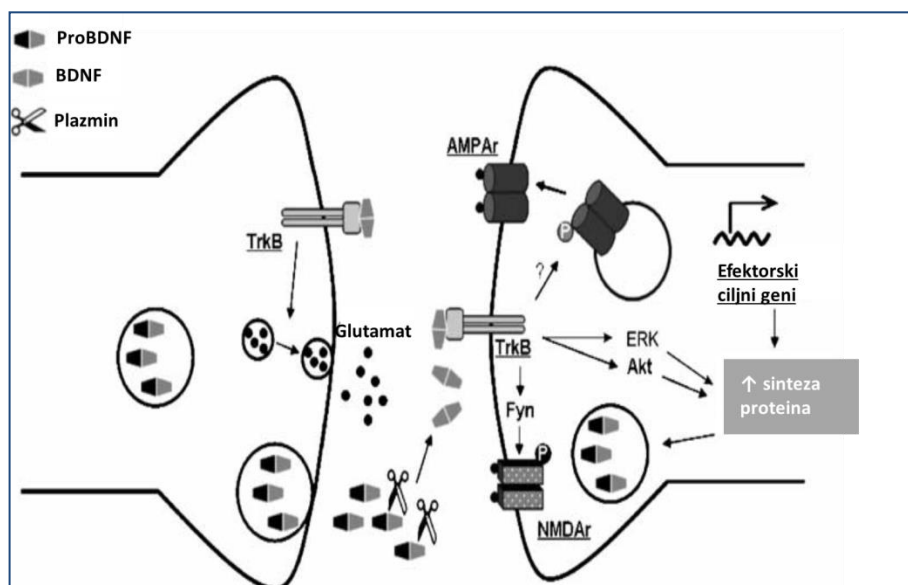
Ovo vezivanje stimuliše dimerizaciju i autofosforilaciju receptora, promene u unutarćelijskim signalima kao što je MAP kinazni put i promene u osobinama neurona od amplitude postsinaptičke struje do mehanizama koji uključuju povećanje aktivnosti NMDA receptora (84). Pored uloga sličnih neuropeptidima-neurotransmitterima, BDNF ima i značajnu trofičku aktivnost. Omogućava preživljavanje neurona i otpornost na stres npr. kod dopaminergičkih neurona koji ekspimiraju i BDNF i trkB receptore. Ekspresija BDNF-a je redukovana u supstantia nigri pacijenata sa Parkinsonovom bolešću i u zahvaćenim kortikalnim regionima pacijenata sa Alchajmerovom bolešću (85,86).

Pokazano je da se u zavisnosti od aktivnosti neurona, BDNF oslobađa i sa presinaptičke i sa postsinaptičke membrane (87) kao i da je njegov receptor TrkB lokalizovan na obe ove membrane (88). Nekoliko unutarćelijskih proteina šaperona, uključujući karboksipeptidazu E (89) koji se vezuju za domene zrele BDNF i sortilin koji se vezuje za prodome BDNF-a (90) identifikovani su kao proteini kandidati koji regulišu unutarćelijsku lokalizaciju BDNF-a u neuronima. Interakcija sortilina sa BDNF je od značaja u usmeravanju unutarćelijskog transporta jer je uočeno da ekspresija dominantno negativne forme sortilina dovodi do preusmeravanja BDNF-a sa regulisanog sekretornog puta na konstitutivni put (90).

Pokazano je da BDNF moduliše proces sinaptogeneze *in vivo* i ima ulogu u ekspresiji dugotrajne potencijacije (LTP-a) u hipokampusu. Dugotrajna potencijacija (LTP) odnosi se na jačanje sinapsi što znači da svaki naredni stimulus brže izaziva postsinaptički odgovor. Najviše je izučavan NMDAR zavisni LTP na sinapsama između Šaferovih kolaterala i komisuralnih neurona u CA1 regionu hipokampusa i predstavlja osnovni eksperimentalni model za izučavanje učenja i pamćenja kod kičmenjaka. LTP se deli na dve uzastopne faze: rani LTP (E-LTP) i kasni LTP (L-LTP). Rana faza traje 1-2 h i zavisi od modifikacije i translokacije već postojećih proteina (91) dok L-LTP traje danima i mesecima (92) i zavisi od *de novo* sinteze proteina i promena u genskoj ekspresiji (93). Analiza sinaptičke transmisije pre i posle LTP-a navela je na zaključak da je povećanje sinaptičke snage koje nastaje po indukciji LTP-a rezultat povećanog oslobađanja neurotransmitera. To znači da se dugotrajna potencijacija indukuje u postsinaptičkim neuronima ali se ispoljava presinaptički. Po ovoj hipotezi, presinaptička ćelija prima signal iz postsinaptičke ćelije (retrogradni signal) koji ukazuje da se dešava indukcija LTP-a i dovodi do povećanog oslobađanja transmitera sa presinaptičke ćelije.

BDNF reguliše E-LTP i L-LTP različitim mehanizmima. Indukciju E-LTP-a olakšava tako što pojačava sinaptički odgovor na tetaničku stimulaciju najverovatnije tako što utiče na mobilizaciju i vezivanje sinaptičkih vezikula regulisanjem distribucije i fosforilacije sinaptičkih proteina. BDNF takođe ima i važnu ulogu u održavanju (ekspresiji) E-LTP-a aktiviranjem tihih (silent) sinapsi. Pokazano je da je sekrecija BDNF-a zavisna od aktivnosti neurona ključna za kratkotrajnu hipokampus zavisnu epizodičku memoriju.

Sa druge strane saznanja o ulozi BDNF-a u indukciji i ekspresiji dugotrajne memorije odnosno L-LTP-a su još uvek nedovoljna. Uočeno je da BDNF utiče na E-LTP oslobađanjem postojećih presinaptičkih BDNF pulova i modifikacijom postojećih pre- i postinaptičkih proteina preko TrkB receptora (94). Nasuprot tome, postoje dokazi da indukcija L-LTP-a zahteva sintezu i oslobađanje proBDNF-a i njegovu ekstracelularnu konverziju u BDNF (82) a zatim BDNF stimuliše *de novo* sintezu proteina značajnih za održavanje L-LTP-a (95). BDNF oslobođen tokom L-LTP je najverovatnije nastao pojačanom translacijom već postojećih iRNK kao i novih iRNK. Pokazano je da se BDNF transkripti transportuju u dendrite neurona hipokampusa u kulturi kao odgovor na KCl-indukovanu depolarizaciju (96). Translacija iRNK lokalizovanih u dendritima služi kao izvor BDNF-a potrebnog za ekspresiju L-LTP-a. Funkcije BDNF-a mogu takođe biti izmenjene i na proteinskom nivou. BDNF i aktivator tkivnog plazminogena (tPA, serin proteaza) učestvuju u mehanizmima odgovornim za kasnu fazu dugotrajne potencijacije (L-LTP) i dugotrajnu memoriju. *In vitro*, proBDNF može biti konvertovan u zreli BDNF plazminom kroz tPA zavisnu aktivaciju plazminogena. U elektrofiziološkim studijama, zreli BDNF, ali ne i proBDNF, omogućava L-LTP kod tPA i plazminogen knock-out miševa (82). Ove studije pokazuju da konverzija proBDNF u zreli BDNF omogućava L-LTP ekspresiju u hipokampusu i obezbeđuje mehanističku vezu između tPA i BDNF, dva proteina uključena u dugotrajnu memoriju (Slika 4.).



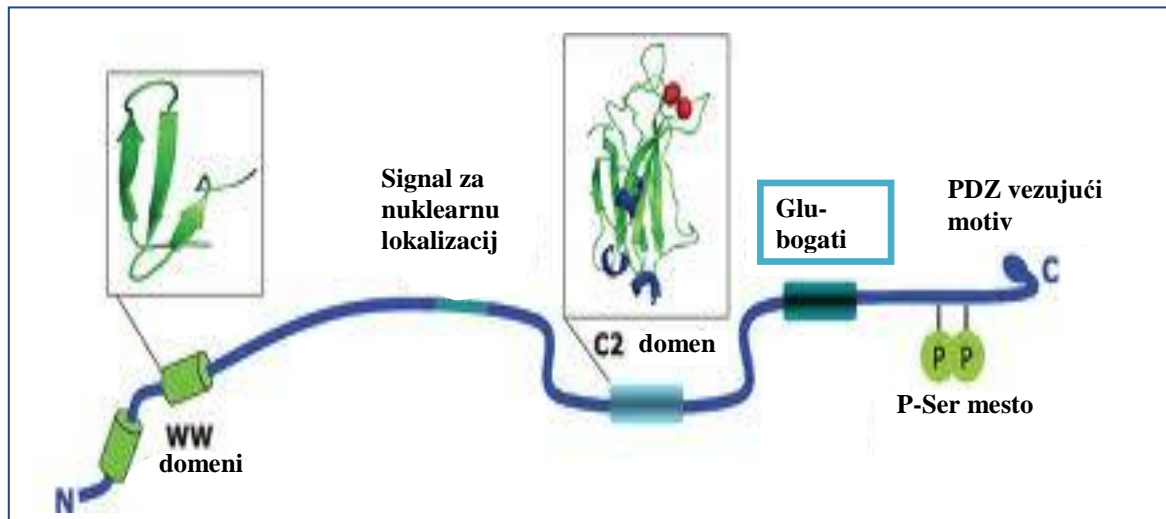
Slika4. Ekstraćelijska konverzija proBDNF u BDNF (72)

Proneurotrofini, uključujući i proBDNF, vezuju se i aktiviraju $p75^{\text{NTR}}$ receptor (97). Studija Woo i sar., 2005 pokazala je da proBDNF i zreli BDNF imaju suprotne sinaptičke efekte kroz aktivaciju dva različita receptora; $p75^{\text{NTR}}$ i Trk receptor tirozin kinaze (73). Da bi se bolje razumeo mehanizam koji kontroliše konverziju proBDNF u BDNF dizajnirani su eksperimenti sa ciljem da otkriju koji su to fiziološki relevantni uslovi koji dovode do sekrecije specifičnih izoformi endogenog BDNF. Pokazalo se da je u uslovima stimulacije niskom frekvencijom koja indukuje pojavu dugotrajne depresije (LTD-a), najvećim delom sekretovan proBDNF (98). Nasuprot tome, kada su neuroni izloženi stimulaciji visoke frekvencije (HFS) koja dovodi do LTP-a detektovane su značajne količine sekretovanog BDNF-a. Interesantno je da je tPA sekretovana samo u slučaju HFS. Dakle, aktivnosti i niske i visoke frekvencije povećavaju proBDNF u ekstraćelijskoj sredini ali samo sekrecija tPA indukovana visokom frekvencijom dovodi do ekstraćelijske konverzije proBDNF u BDNF. Ovi rezultati pokazuju kako HSF aktivnost neurona može regulisati suprotne funkcije izoformi BDNF-a. Primena različitih promotorskih elemenata, selektivna upotreba 3' UTR regiona da bi se usmerio transport, regulacija sazrevanja proBDNF-a isecanjem i korišćenje različitih unutarćelijskih šaperona da usmeravaju unutarćelijski transport pruža raznovrsni repertoar mogućnosti centralnom nervnom sistemu da brzo i precizno moduliše ekspresiju, lokalizaciju i sinaptiču isporuku BDNF-a.

4. KIBRA

4.1. Struktura gena i proteina

Joachim Kremerscothen otkrio je 2003.god. citoplazmatski protein KIBRA (engl. Kidney brain protein) kao jedan od molekula koji interaguje sa humanim postsinaptičkim proteinom dendrinom. KIBR-u kodira gen *WWCI* lociran na dugom kraku hromozoma broj 5 (5q35.1) (99). Gen čini 4 promotora, 23 egzona, 5 alternativnih krajnjih egzona i 4 alternativna mesta poliadenilacije. Transkripcijom nastaje 16 različitih zrelih iRNK koje se među sobom razlikuju po 5' kraju, 3' kraju i 3 preklapajuća egzona. Njih 14 nastaje alternativnim splajsovanjem dok dve varijante nisu obrađene splajsovanjem. Gen se predominantno eksprimira u bubrezima i mozgu i kodira citoplazmatski protein od 125kDa, dužine 1113 aminokiselina koji sadrži dva amino-terminalna WW domena, unutrašnji motiv sličan C2 domenu sinaptotagmina, karboksi-terminalni nastavak bogat glutaminskim ostacima i PDZ vezujući motiv (99). Analize su pokazale da prvi WW domen učestvuje u interakciji KIBRA-e sa PPxY motivima ciljnih polipeptida. WW domen je najmanji globularni domen koji ostvaruje interakcije sa ciljnim proteinima tako što se vezuje za sekvence bogate prolinima. (Slika 5.) WW domeni su pronađeni kod citoplazmatskih i nuklearnih proteina koji učestvuju u brojnim ćelijskim funkcijama kao što su: degradacija proteina, regulacija transkripcije, splajsovanje RNK i clustering (grupisanje) proteina. U mozgu sisara WW domene sadrži i familija membranskih guanilat kinaza za koje se pretpostavlja da funkcionišu kao regulatori neurotransmisije i sinaptičke plastičnosti. Prisustvo unutrašnjeg C2 nalik domena ukazuje da je KIBRA i Ca^{2+} vezujući protein (99). Molekuli KIBRA-e organizovani su kao antiparalelni homodimeri.



Slika 5. Struktura KIBRA proteina (114)

4.2. Polimorfizam u genu za KIBRA protein

Papasotiropulos i saradnici su po prvi put primenili pristup studije asocijacije čitavog genoma i ispitivali asocijaciju 500000 SNP-ova sa memorijskim sposobnostima. Najjača asocijacija uočena je za polimorfizam **rs17070145** koji nastaje supstitucijom timina (T) citozinom (C) u devetom intronu gena za KIBRA protein. U tri nezavisna uzorka osoba mlađe i srednje životne dobi uočeno je da nosioci CC genotipa imaju lošije rezultate u testovima verbalne i vizuelne epizodičke memorije u poređenju sa nosiocima T alela (54). Uočena je i asocijacija T alela sa povećanim rizikom od Alchajmerove bolesti kod osoba starijih od 86 godina (100). Za sada, koliko je nama poznato, nema podataka o tome da li i na koji način analizirani polimorfizam utiče na ekspresiju gena, strukturu ili funkciju KIBRA proteina.

4.3. Funkcija KIBRA proteina

Imunohistohemijskim metodama pokazano je da se KIBRA eksprimira prevashodno u neuronima telencefalona, posebno u hipokampusu i korteksu (101). Ova otkrića podržavaju studije koje ukazuju na specifičnu funkciju KIBRA-e u neuronima bitnu za odvijanje memorijskih procesa. Značajna ekspresija KIBRA-e otkrivena je u Purkinje ćelijama odgovornim za kontrolu implicitnog i asocijativnog učenja. Takođe,

uočeno je da distribucija KIBRA-pozitivnih neurona odgovara distribuciji magnocelularnih hipotalamičkih neurona koji eksprimiraju vazopresin i oksitocin što ukazuje da funkcija KIBRA-e nije ograničena samo na procese formiranja memorije i učenje već je bitna i za funkcionisanje neuroendokrinog sistema (101). Na subcelularnom nivou lokalizacija KIBRA proteina odgovara lokalizaciji dendrina i sinaptotagmina i smatra se da ih KIBRA regrutuje zajedno sa drugim postsinaptičkim molekulima u postsinaptičku gustinu time regulišući arhitekturu postsinaptičkog citoskeleta (101). Dok se ekspresija KIBRA-e povećava u ranim fazama sinaptogeneze u adultnom mozgu je pronađen nizak nivo ovog proteina. Ova saznanja ukazuju da KIBRA ima ulogu ne samo u morfološkim promenama postojećih sinapsi već je i od ključnog značaja u početnim fazama neuro- i sinapto-geneze.

Dosadašnji rezultati ukazuju da KIBRA direktno interaguje sa protein kinazom C ζ (PKC ζ) koja vrši fosforilaciju njegovog WW domena (99). U perinuklearnim regionima ćelija uočena je jasna kolokalizacija KIBRA-e i PKC ζ . PKC ζ je član familije atipičnih protein kinaza C koje se po svojoj strukturi izdvajaju prisustvom samo jednog zinc finger modula (102, 103, 104). Brojne studije su pokazale da je ova PKC uključena u procese signalne transdukcije koji regulišu različite ćelijske procese kao što su rast i diferencijacija ćelija (105). Glavni put aktivacije PKC zavisi od fosfatidil inozitol-3,4,5-trifosfata (PIP3) koji proizvodi PI-3 kinaza (102, 103). Nakon aktivacije PKC interaguje se drugim signalnim molekulima i povezujućim proteinima i formira velike komplekse. Novije studije pokazale su da je aktivnost PKC kritična za konsolidaciju dugotrajne potencijacije i formiranje memorije (106,107).

Takođe je primećena i interakcija KIBRA-e sa PKM ζ , konstitutivno aktivnom kinazom koja se eksprimira samo u mozgu. Biohemijska posledica fosforilacije KIBRA-e za sada je nepoznata. Za sada se zna samo da fosforilacija ne utiče na lokalizaciju proteina. Fragment od 44kDa koji sadrži mesto fosforilacije je deo domena za dimerizaciju pa se pretpostavlja da fosforilacija reguliše formiranje dimera KIBRA-e. Fosforilacija KIBRA-e može uticati na kapacitet za vezivanje ili na specifičnost WW domena pa time i na asocijaciju KIBRA-e sa drugim signalnim molekulima (105).

Interakcija sa postsinaptičkim proteinom dendrinom ukazuje na moguću strukturnu ulogu KIBRA-e. Dendrin se sintetiše sa iRNK lokalizovanih u dendritima i

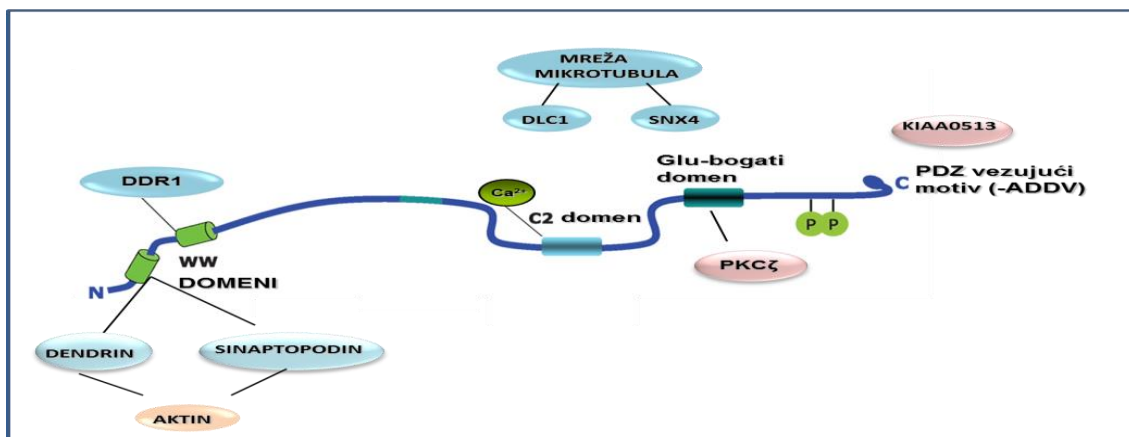
interaguje sa α -aktininom i sinaptičkim povezujućim molekulom S-SCAM (108). Pretpostavlja se da KIBRA učestvuje u procesima koji se odvijaju u postsinaptičkoj gustini (PSD), što je potvrđeno identifikacijom druga dva proteina koji interaguju sa KIBRA a to su sinaptopodin i PKC ζ (105, 109-135). Kao i dendrin i sinaptopodin se vezuje za PPxY motiv u okviru WW domena KIBRA-e. Oba proteina su lokalizovana u dendritima i imaju važnu ulogu u organizaciji citoskeleta (99, 109). Uloga sinaptopodina u dendritičnim trnovima uočena je kod knock-out miševa kod kojih odsustvo sinaptopodina dovodi do poremećaja u dugotrajnoj sinaptičkoj plastičnosti građi dendritskih trnova (110, 111). Na subćelijskom nivou gust sloj citoskeletnih proteina, povezujućih molekula, jonskih kanala i transmembranskih receptora formira postsinaptičku gustinu neurona. Smatra se da PSD ostvaruje brojne funkcije u formiranju memorije. Najbitnije je da deluje kao organizator mašinerije za postsinaptičku transdukciju signala koji povezuju regulatorne molekule sa njihovim metama, koordiniše promene tokom razvoja i kontroliše remodelovanje postsinaptičkih struktura u zavisnosti od njihove aktivnosti. Najnovija otkrića ukazuju da su posebno povezujući proteini, u koje se ubraja i KIBRA, bitne komponente PSD jer interaguju i povezuju različite proteine bitne za formiranje memorije na vremenski i prostorno regulisan način (112).

Još jedan od proteina koji interaguje sa KIBRA-om a od značaja je za kognitivne procese je KIAA0513. Ekspresija KIAA0513 je povećana u mozgu pacijenata sa šizofrenijom, ali ćelijska funkcija ovog proteina je nepoznata (113). Može se pretpostaviti da bi interakcija KIAA0513 sa KIBRA-om mogla biti još jedna karika u objašnjenju kognitivnog deficita u ovoj bolesti (114).

KIBRA direktno interaguje sa PICK1 kao i sa GluA1, GluA2 i drugim sinaptičkim proteinima formirajući proteinski kompleks. Pokazano je da odsustvo KIBRA-e značajno ubrzava stepen recikliranja GluA2. Na osnovu toga možemo zaključiti da KIBRA ima važnu ulogu u regulaciji transporta AMPA receptora u procesu učenja i sinaptičke plastičnosti (115).

Otkrićem proteina sa kojima KIBRA interaguje pokazano je da KIBRA učestvuje u i u drugim važnim ćelijskim funkcijama kao što su ćelijska polarnost i migracija, transport vezikula, regulacija transkripcije i sinaptogeneza (109).

Identifikacija proteina PATJ (PALS1-associated tight junction protein) kao molekula koji interaguje sa PDZ-vezujućim regionima KIBRA ukazuje na moguću ulogu KIBRA u ćelijskoj polarnosti. PATJ pripada kompleksu evolutivno očuvanih multiproteinskih kompleksa koji regulišu ćelijsku polarnost u podocitima i neuronima kao i subćelijsku lokalizaciju atipičnih PKC i Par3 u epitelnim ćelijama (116, 117). Uzevši sve u obzir ove sličnosti ukazuju na preklapajuće funkcije KIBRA i PATJ u modulaciji ćelijske plastičnosti i migracije ćelija koje su ektodermalnog porekla. Identifikacija KIBRA-e u PSD, interakcija sa proteinima ćelijske polarnosti i uloga u migraciji ćelija ukazuje na centralnu ulogu KIBRA-e u rearanžmanu ćelijskog citoskeleta. Druga veza KIBRA-e sa ćelijskim citoskeletom potiče od njegove interakcije sa dineinskim kompleksom. Pokazano je da sorting nexin 4 (SNX4) interaguje sa kompleksom dineina, motora mikrotubula i KIBRA-om i da ovaj kompleks reguliše usmeravanje transferinskog receptora (TfnR) ne ka degradaciji, već ka putu za recikliranje. Nishodna regulacija SNX4, KIBRA ili dineinskih proteina narušava transport TfnR i povećava lizozomima posredovanu degradaciju receptora (118). Opisana je i istovremena interakcija KIBRA-e sa histonom H3 i lakim lancem dineina 1 (DLC1). Vezivanje KIBRA-e za histon 3 ostvaruje se preko regiona bogatog glutaminima u blizini C terminusa (Slika 6.). Delecija histon vezujućeg regiona KIBRA-e dovodi do inhibicije transaktivacije estrogenskog receptora α u ćelijama humanog karcinoma dojke (119). Iako se KIBRA vezuje za histon i zadržava u jedru mehanizam transaktivacije ostaje nejasan. Da KIBRA učestvuje u regulaciji transkripcije potvrđeno je i u studiji koja pokazuje da postoji ushodna regulacija KIBRA-e primenom progesterona i da se KIBRA vezuje za diskoidni domen receptora 1 (DDR1) tirozin kinaze važne za razvoj mlečnih žlezdi (120). KIBRA i DDR1 interaguju zajedno sa PKC ζ u kompleksu uključenom u kolagenom regulisani MAP signalni put.



Slika 6. Proteini koji interaguju sa KIBRA-om (114)

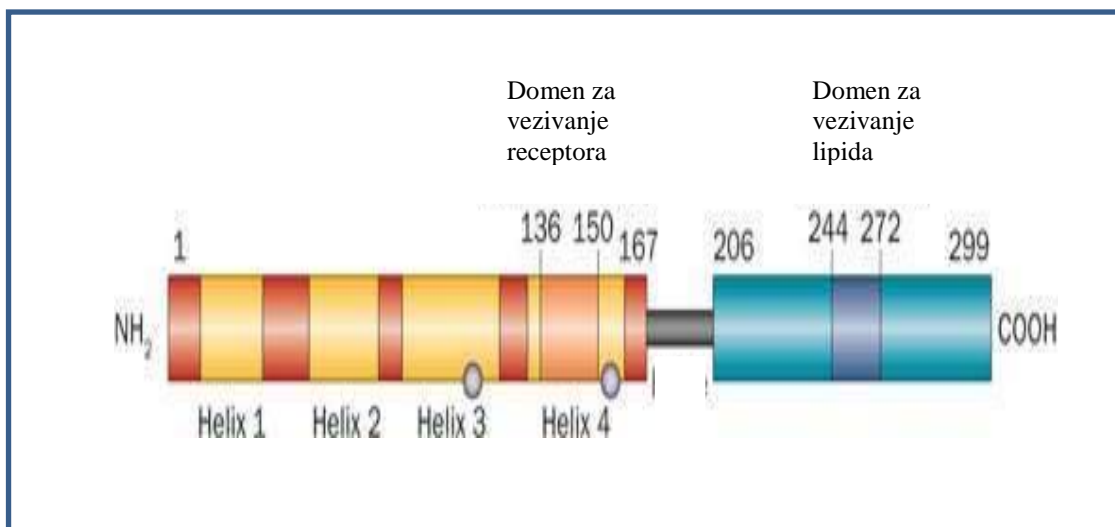
Postoje eksperimentalni dokazi koji povezuju KIBRA-u sa Alchajmerovom bolešću. Ekspresija KIBRA-e je znatno izmenjena u neuronima koji sadrže neurofibrilarnu klubad u ključnim regionima mozga pacijenata sa AB. U neuronima disekovanim laserom iz hipokampusa, srednjeg temporalnog girusa i zadnjeg cinguluma koncentracija iRNK KIBRA-e povećana je 2.4-3 puta dok je iRNK PKC u istim regionima mozga smanjena 2.3-3.3 puta. Značajne razlike nisu primećene u primarnom vizuelnom korteksu, regionu koji nije pogođen sa AB (121).

5. APOLIPOPROTEIN E (APOE)

5.1. Struktura gena i proteina

Gen za APOE (apolipoprotein E) nalazi se na dugom kraku hromozoma 19 (19q13.2) i obrazuje klaster zajedno sa APOC1, pseudo APOC1, APOC2 i APOC4 genima (122,123). Gen sadrži 3597 nukleotida i sastoji se od 4 egzona dužine 44, 66, 193 i 860 bp (124). Zreo transkript je dužine 1163 nukleotida. APOE se sintetiše kao polipeptid od 317 aminokiselina koji podleže post-translacionoj obradi i isecanju signalnog peptida od 18 aminokiselina pa zreli protein sadrži 299 aminokiselina. Ekspirira se u različitim organima uključujući jetru, mozak, bubrege i srž nadbubrežne žlezde (125). Tkivno specifična ekspresija pod kontrolom je elemenata raspoređenih po celom genskom C1-C1-C2-C4 klasteru (126-127).

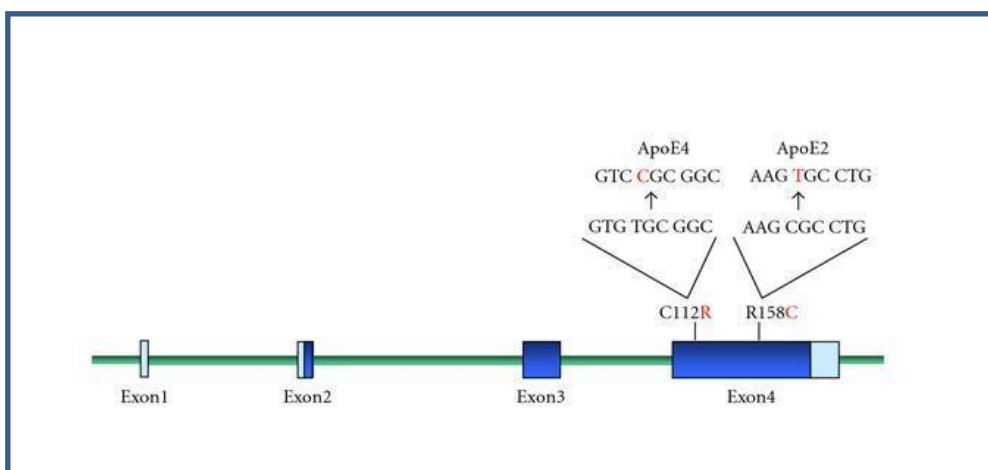
APOE je jednonačani glikoprotein od približno 34.2 kDa. Nakon *in vitro* digestije trombinom razdvaja se na dva domena: amino-terminalni, globularni, domen od 22kDa od 1. do 191. aminokiseline i C-terminalni, fibrilarni, domen od 10 kDa koji se pruža od 216-te do 299-te aminokiseline (128,129). Ova dva domena su rezistentna na proteolizu i razdvojena su regionom koji je podložan proteolizi. C-terminalni deo proteina je organizovan u vidu 4 α -heliksa i sadrži heparin-vezujuće mesto između aminokiselina 214 i 223 (130) i mesto za vezivanje lipida između aminokiselina 245 i 266 (131). NH₂-terminalni deo proteina sadrži domen za vezivanje receptora od 130-te do 150-te aminokiseline (132). Pozitivno naelektrisani aminokiselinski ostaci receptor-vezujućeg domena interaguju sa negativno naelektrisanim ostacima prisutnim na ligand-vezujućem domenu receptora. (Slika 7.)



Slika 7. Struktura APOE proteina (148)

5.2. Polimorfizmi APOE gena

APOE gen javlja se u vidu tri glavne alelne forme: E2, E3 i E4 koje obrazuju 6 različitih genotipova (E3/E3, E3/E4, E3/E2, E2/E2, E2/E4, E4/E4). Aleli E2, E3 i E4 su definisani haplotipom na pozicijama 7903 i 8041 u četvrtom egzonu gena. Ovaj haplotip određuje aminokiselinski sastav na položaju 112 i 158 u proteinu. Supstitucija timina (T) u citozin (C) u kodonu 112 dovodi do zamene Cys sa Arg (rs429358) dok supstitucija C u T u kodonu 158 dovodi do zamene Arg sa Cys (rs7412). E3 varijanta na poziciji 112 ima Cys, a na poziciji 158 Arg. E2 varijanta na obe pozicije ima Cys, a E4 na obe pozicije Arg. (122,133,134) (Slika 8.) Takođe, detektovana je i izuzetno retka varijanta E1 (samo 4 zabeležena slučaja) kod koje se na poziciji 112 nalazi Arg a na poziciji 158 Cys. Smatra se da je E4 divlji, ancestralni alel u humanim populacijama ali je tokom evolucije postojala jaka negativna selekcija protiv E4 i favorizovan je E3. Tri glavne izoforme proteina označene kao ApoE2, ApoE3 i ApoE4 razlikuju se po položaju nakon izoelektričnog fokusiranja: E2 je najbaznija dok je E4 najkiselija izoforma.



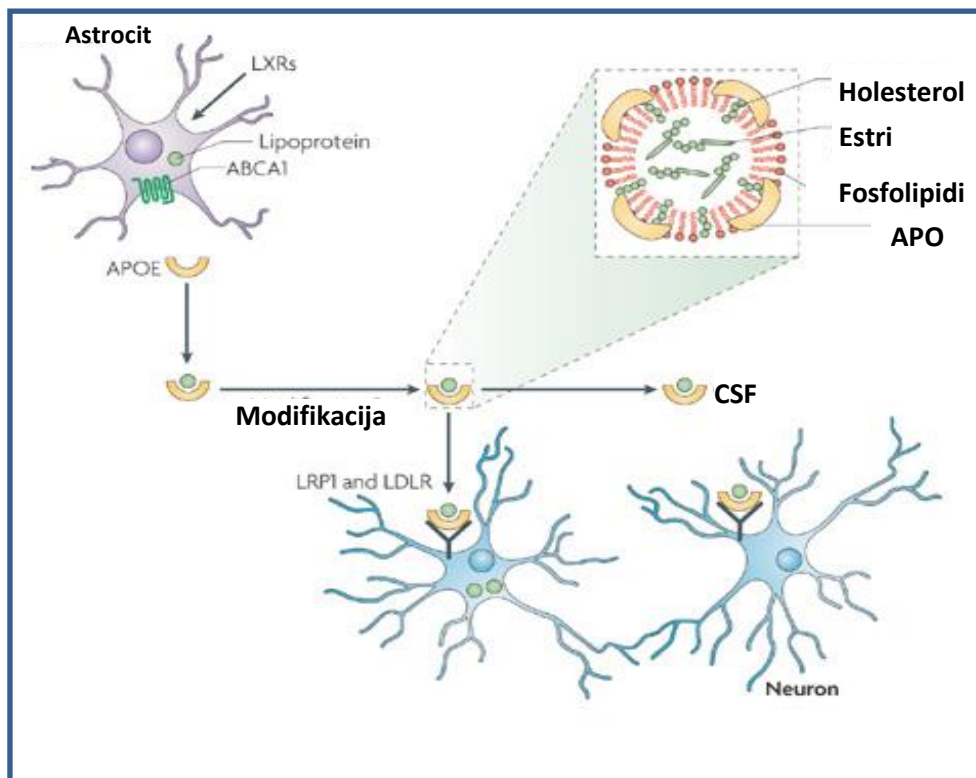
Slika 8. Struktura APOE gena, sekvenca u donjem redu definiše E3 alel

Uključujući i najčešću varijantu APOE3 do sada je opisano 30 različitih varijanti APOE proteina. Različite APOE varijante dele se na: uobičajene (česte) varijante u koje spadaju APOE3, APOE4 i APOE2; APOE varijante povezane sa familijarnom disbetalipoproteinemijom (FD); APOE varijante povezane sa drugim hiperlipidemijama i retke varijante koje nisu povezane sa hiperlipidemijama (132). Četiri varijante APOE daju protein čija se veličina razlikuje od APOE3 najčešće usled pojave mutacija koje dovode do prerane pojave stop kodona i to su: APOE3-Leiden, APOE3 Washington, APOE0 (Δ G2919/2920/2921-stop60), APOE0 (A3592G) (135,136).

5.3 Funkcija APOE proteina

APOE je apolipoprotein čija ključna uloga u mozgu je transport holesterola među ćelijama. U mozgu APOE se sintetiše prevashodno u astrocitima i deo je lipoproteinskih čestica koje sadrže holesterol i fosfolipide. Holesterol spada u molekule ključne za razvoj i normalno funkcionisanje centralnog nervnog sistema (CNS-a) (137). Holesterol igra važnu ulogu u razvoju i održavanju plastičnosti nervnog sistema (138,139,140), transportu sinaptičkih vezikula duž mikrotubula (141) i oslobađanju neurotransmitera (140). Membrana sinaptičkih vezikula sadrži veliku količinu holesterola i proteina koji interaguju sa holesterolom pa je on neophodan za njihovu

biogenezu. Nedostatak holesterola onemogućava neurotransmisiju i narušava sinaptičku plastičnost. Krvno-moždana barijera sprečava import lipoproteina plazme u mozak. Usled toga mozak ima svoj nezavisan transportni sistem u okviru kojeg glijalne ćelije proizvode lipoproteine koji neuronima dostavljaju holesterol neophodan za izrastanje neurita i popravljanje oštećenja na neuronima (142) (Slika 9.).

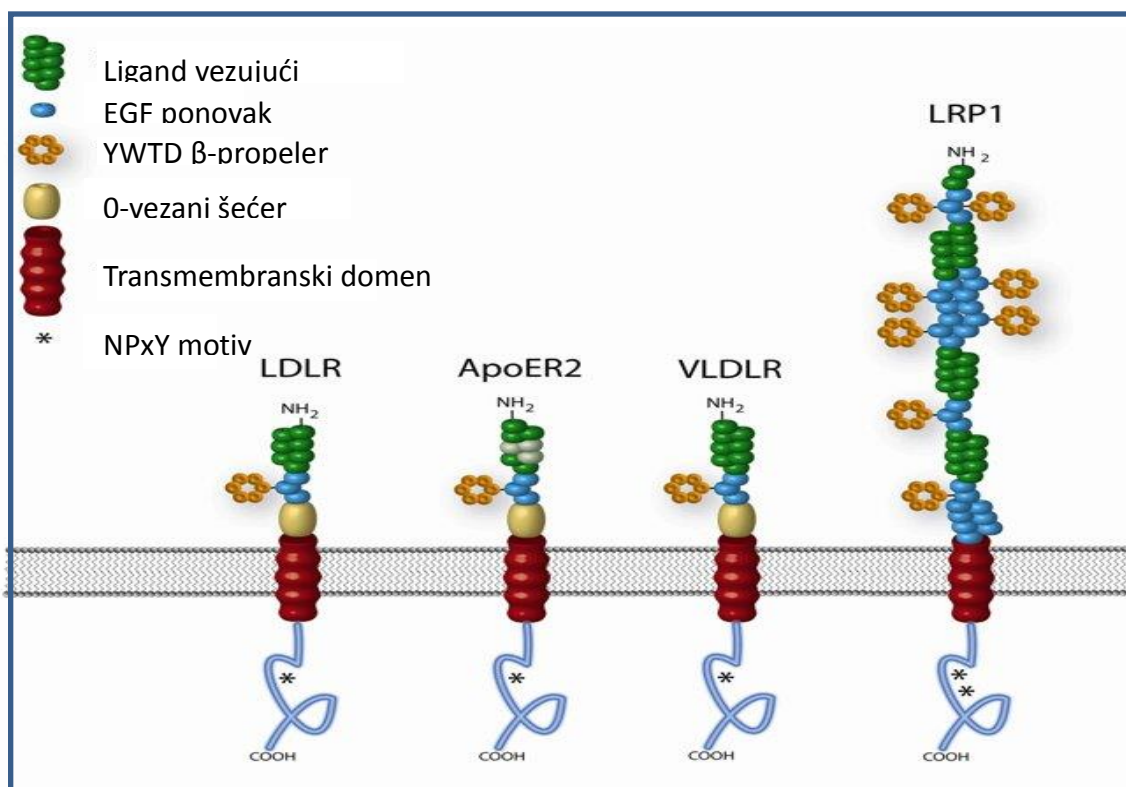


Slika 9. Transport holesterola od astrocita do neurona (145)

U neuronima se pod određenim uslovima takođe odvija sinteza holesterola i to u telu neurona odakle se zatim transportuje do aksona anterogradnim transportom. Iako se holesterol sintetise i u neuronima postoji dovoljno dokaza o tome da rast neurona i efikasno formiranje sinapsi zavisi od holesterola poreklom iz astrocita. Kako neuroni sazrevaju i smanjuju endogenu sintezu holesterola sve više zavise od egzogenog holesterola (143).

APOE ulazi u sastav VLDL (lipoproteini vrlo male gustine) čestica sintetisanih u jetri a prisutan je i u hilomikronima, hilomikronskim ostacima i HDL (lipoproteini velike gustine) česticama. U cerebrospinalnoj tečnosti APOE-lipoproteinske čestice su veličine i gustine HDL čestica plazme, sferične su i sadrže esterifikovani holesterol

(144). APOE-lipoproteinske čestice se vezuju za familiju lipoproteinskih receptora male gustine (LDLR) (145). Identifikovano je više od 10 članova ove receptorske familije. Za sve je karakteristično prisustvo ligand-vezujućih ponovaka, EGF- nalik ponovaka, b-propeler nalik strukture sa YWDT motivom (Slika 10.). Glavni receptori za APOE u mozgu su LDLR i LRP1. Iako oba receptora imaju ulogu u metabolizmu lipoproteina njihove uloge su različite. LRP1 se eksprimira u većoj meri na neuronima a manje na ćelijama glije dok se LDLR eksprimira u većoj meri na ćelijama glije a manje u neuronima (146,147). Pokazano je da delecija LRP1 gena dovodi do redukcije nivoa holesterola u mozgu dok delecija LDLR gena nema takav efekat (148,149). Na kraju, pokazano je da se APOE lipoproteinske čestice vezuju za LDLR sa većim afinitetom (149). Iako receptor vezujući domen (136-150 ak.) ne obuhvata aminokiseline na 112-oj i 158-oj poziciji vezivanje za LDL receptor zavisi od izoformi APOE. Afinitet E2 za LDLR je 100 puta manji nego afinitet E3 i E4 što narušava metabolizam lipida i vodi aterosklerozi (150).



Slika 10. Receptori sa kojima APOE interaguje (146)

5.4. Uloga APOE u memorijskim procesima

Najviše informacija o ulozi APOE u memorijskim procesima potiče iz eksperimenata na miševima koji eksprimiraju humane varijante APOE. Ovi eksperimenti pokazali su da postoji razlika u uticaju APOE izoformi na dugotrajnu potencijaciju (LTP) i prostornu memoriju (151). Miševi koji su eksprimirali E3 izoformu imali su iste rezultate i podjednaku indukciju LTP-a kao i WT miševi. Za razliku od njih, kod miševa koji su eksprimirali E4 izoformu došlo je do narušavanja indukcije LTP-a i prostornog učenja. Defekt u memoriji bio je izraženiji kod ženki što odgovara rezultatima studija na ljudima koje pokazuju da su štetni efekti E4 forme izraženiji kod žena (152). Skorija istraživanja William-a, Rebeck-a i kolega pokazala su da je APOE uključen u najmanje tri puta signalne transdukcije: ERK, c-jun N-terminalna kinaza (JNK) i Disabled-1 (Dab-1). Svaki od ovih puteva značajno utiče na sinaptičko pojačavanje indukovano aktivnošću neurona. U kulturi primarnih neurona aplikacija APOE pune dužine ili samo peptida koji sadrži receptor vezujući domen povećava stepen aktivacije ERK i Dab-1 a snižava aktivaciju JNK. Takođe, primećeno je da su APOE indukovana fosforilacija ERK1/2 i regulacija Dab-1 puta zavisne od funkcije NMDA receptora. Interesantno je da APOE zavisna regulacija JNK uključuje i aktivnost γ -sekretaze koja seče određene transmembranske proteine uključujući i amiloidni prekursori protein (APP) i LDLR (153). Na osnovu navedenih rezultata vidi se da je APOE važan modulator sinaptičke plastičnosti i formiranja memorije.

Iako se smatra da je APOE prevashodno molekul čija je uloga transport lipida, skorija otkrića ukazuju na dodatne uloge APOE u mozgu uključujući regulaciju funkcije astrocita i neurona. U nekoliko studija pokazano je da APOE ima važnu ulogu u regulaciji homeostaze Ca^{2+} čime može uticati na regulaciju funkcije različitih jon-zavisnih receptora uključujući i K^+ antiportere (154, 155). Brojne studije su pokazale i ulogu APOE u modulaciji oslobađanja neurotransmitera povećanjem stepena uklanjanja glutamata čime se sprečava njegova ekscitotoksičnost (156). APOE takođe povećava efekat nekih faktora rasta kao što je cilijarni trofički faktor (CNTF) koji stimuliše preživljavanje i grananje neurona (157). Takođe, štiti neurone od oksidativnog stresa, redukcijom toksičnosti hidrogen peroksida što je pokazano na ćelijskim linijama glijalnih ćelija. Pokazano je da E3 pruža bolju zaštitu od oksidativnog stresa u poređenju sa E2 i E4. APOE ima ulogu i u regulaciji urođenog i stečenog imunog

odgovora tako što inhibira proliferaciju neutrofila i limfocita kao i aktivaciju T-limfocita (158). Sinteza APOE je regulisana citokinima pa je moguće da APOE putem mehanizama negativne ili pozitivne povratne sprege reguliše transdukciju signala citokina. Pokazano je da makrofagi i astrociti menjaju sekreciju APOE nakon primene različitih inflamatornih stimulusa što potvrđuje ulogu APOE u imunološkim reakcijama (159).

5.5. Uloga APOE u Alchajmerovoj bolesti

Zapažanje da se APOE vezuje za amiloid β ($A\beta$) u cerebrospinalnoj tečnosti učinilo je APOE glavnim kandidatom za studije asocijacije sa Alchajmerovom bolešću (AB). E4 alel kao faktor koji utiče na vreme i brzinu progresije AB otkrili su 1993. Strittmatter, Roses i saradnici. Nakon prvobitnog otkrića njegova uloga je potvrđena u brojnim asocijativnim studijama. Efekat E4 alela najizraženiji je u periodu između 60 i 70 god. života kada je prevalenca E4 alela među obolelima veća od 50% (145). Pokazano je da ovaj alel povećava rizik i od ishemijskih cerebrovaskularnih bolesti što takođe može doprineti kognitivnom deficitu povezanom sa godinama starosti. Različite studije su pokazale da E4 alel predstavlja i faktor rizika za aterosklerozu, progresiju HIV-a, cerebralnu amiloidnu angiopatiju, demenciju sa Luijevim telima, Parkinsonovu bolest i multiplu sklerozu (160). Ova zapažanja ukazuju da E4 alel može biti asociiran sa ubrzanom neurodegeneracijom.

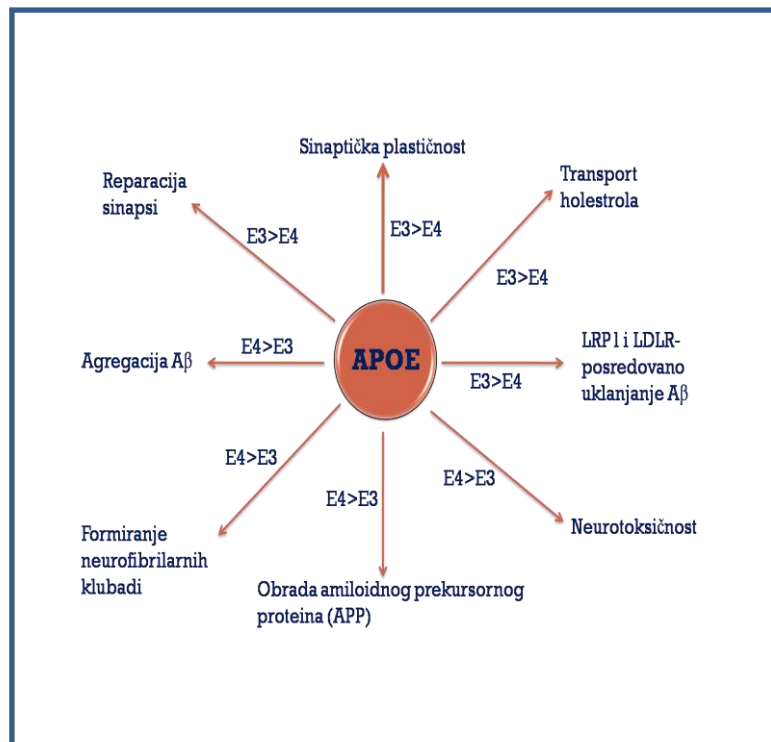
Akumulacija, oligomerizacija i skladištenje $A\beta$ u mozgu je centralni događaj u patogenezi AB. Akumulacija $A\beta$ posledica je njegove prekomerne produkcije i nedovoljnog uklanjanja iz mozga. Sve više je dokaza da APOE i njegovi receptori imaju važnu ulogu u oba ova procesa (145). Nekoliko tipova APOE receptora može se direktno vezati za APP i modulirati njegov transport i obradu do $A\beta$ (161). Pokazano je da APOE izoforme različito regulišu obradu APP-a do $A\beta$ preko mehanizama koji zavise od funkcije LRP1. Na osnovu dosadašnjih saznanja smatra se da APOE4 povećava produkciju $A\beta$ za razliku od APOE3 alela (162). Postoje dva glavna puta kojima se $A\beta$ uklanja iz mozga: receptorima posredovano uklanjanje u ćelijama moždanog parenhima (mikroglija, astrociti, neuroni) i uklanjanje kroz krvno-moždanu barijeru. Receptorima posredovano uklanjanje se odvija preko APOE receptora: LDLR,

LRP1 i VLDLR koji se eksprimiraju u neuronima, astrocitima i mikrogliji moždanog parenhima kao i endotelijalnim ćelijama, astrocitima i glatkim mišićnim ćelijama u nivou krvno-moždane barijere i cerebralnih arterija. APOE receptori mogu vezivati A β direktno ili indirektno preko A β šaperona. APOE je najbolje okarakterisan šaperon za A β do sada (145). Region za vezivanje A β je u C-terminalnom domenu APOE i preklapa se sa regionom za vezivanje lipida. Zaista, vezivanje A β za APOE kompromituje njegovu ulogu u transportu lipida. Ovi rezultati pokazuju da A β peptidi onemogućavaju normalno funkcionisanje APOE u metabolizmu lipida u mozgu i time doprinose patogenezi AB. APOE3 čestica vezuje se za A β sa većim afinitetom u poređenju sa APOE4. Shodno tome E3 uklanja A β preko APOE receptora efikasnije nego APOE4 (163). *Post.mortem* studije pokazale su da nosioci E4 alela i kod sporadičnih (164) i kod naslednih formi bolesti imaju više amiloidnih plakova (165). Uočeno je da vezivanje A β za APOE4 preusmerava uklanjanje sa LRP1 na VLDLR koji internalizuje A β -APOE4 komplekse na krvno-moždanoj barijeri sporije od LRP1 (166). Sa druge strane A β -APOE2 i A β -APOE3 kompleksi se ukanjaju preko oba tipa receptora znatno brže. Receptorima posredovano uklanjanje je efikasan mehanizam za redukciju A β jer se A β internalizovan APOE receptorima šalje u lizosome gde se razgrađuje. Ipak, moguće je da receptorima posredovano uklanjanje u neuronima može dovesti do intraneuronalne akumulacije što je toksično za ćelije (167). A β se u ćelijama uklanja proteolitičkom degradacijom. A β proteaze koje se eksprimiraju u neuronima i vaskularnim ćelijama su neprilisin (membranska metaloendopeptidaza) i insulin-degradijući enzim (IDE). Pokazano je da aktivnost oba ova enzima redukovana kod nosilaca APOE4 alela (145).

Postavljena je hipoteza o asocijaciji metabolizma holesterola i rizika od AB. Nivo holesterola u mozgu osoba obolelih od AB je niži nego u mozgu zdravih osoba (168). Pokazalo se da APOE4 miševi imaju niži nivo holesterola u mozgu čak iako su vrednosti perifernog holesterola povišene (169). Postoje i dokazi da je APOE4 manje efikasan od APOE3 u transportu holesterola. Pokazano je da je potrebno manje E3 nego E4 molekula za formiranje lipidnih čestica. Astroцити koji eksprimiraju APOE3 mogu da snabdeju neurone sa više holesterola nego što je to slučaj sa onima koji eksprimiraju APOE4. Uprkos ovim interesantnim zapažanjima potrebna su dodatna istraživanja o uticaju različitih izoformi APOE na metabolizam holesterola u mozgu. Pored

holesterola APOE vrši transport i drugih lipida u mozgu od kojih se neki ne sintetišu u astrocitima. Na primer sulfatid koji se sintetiše u oligodendrocitima a koji je ključan za integritet neuronskih trnova i mijelinskog omotača. Sulfatid je i potencijalni biomarker za AB jer se njegova koncentracija smanjuje u mozgu osoba sa AB.

Propadanje sinapsi je rana patološka promena u AB. APOE- i APOE receptorima- posredovana redistribucija lipida i signaling imaju važnu ulogu u integritetu sinapsi i plastičnosti nervnog sistema. Sve je više dokaza da različite izoforme različito regulišu sinaptičku plastičnost i popravku oštećenih sinapsi (Slika 11.). Primarna uloga APOE prilikom njegove traumom indukovane ekspresije je redistribucija lipida i jačanje APOE posredovane transmisije signala za popravku neurona i sinapsi. Pokazano je da APOE3 stimuliše izrastanje neurita dok E4 smanjuje ili pak nema efekta (170). Slično tome, APOE3 lipoproteinske čestice su efikasnije u zaštiti neurona od apoptoze (171). Ove studije ukazuju da je APOE4 manje efikasan u održavanju i popravljanju sinapsi i neurona što može da objasni zašto u slučaju oštećenja neurona prilikom povreda mozga ili šloga osobe sa APOE4 imaju lošiji ishod.



Slika 11. Razlike u funkcijama APOE4 i APOE3 (145)

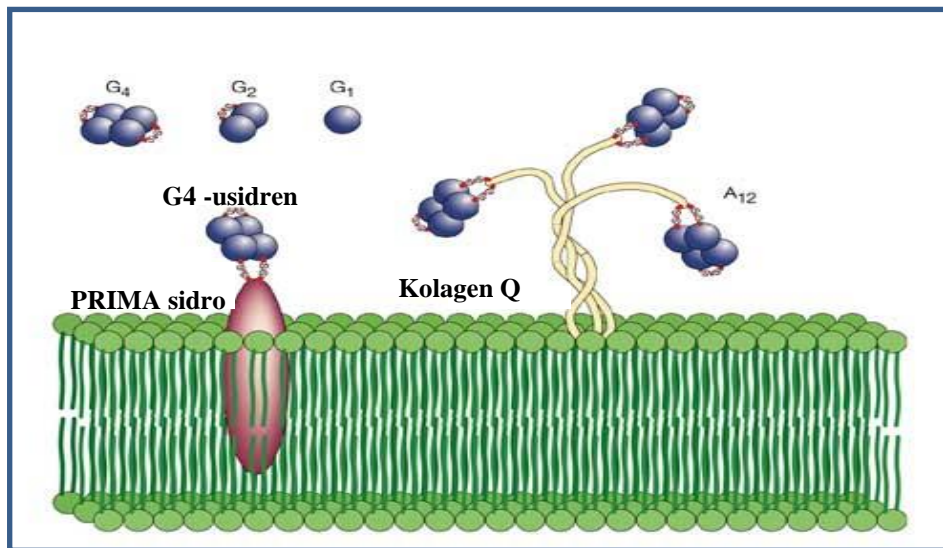
Moguće je da je AB posledica kumulacije oštećenja od A β i drugih stresora kao što je oksidacija i inflamacija. APOE izoforme različito regulišu i izrastanje dendritskih trnova. Kod AB pacijenata i kontrola APOE4 je u obrnutoj korelaciji sa gustinom dendritskih trnova. Razlike u funkcionisanju APOE3 i APOE4 varijante prikazane su na slici 11.

6. BUTIRILHOLIN ESTERAZA (BChE)

6.1. Struktura gena i proteina

Gen za butirilholin esterazu nalazi se na dugom kraku hromozoma broj 3 (3q26.1-3q26.2), (172) dužine je oko 70kb i sastoji se od četiri egzona i tri velika izrazito dugačka introna (173).

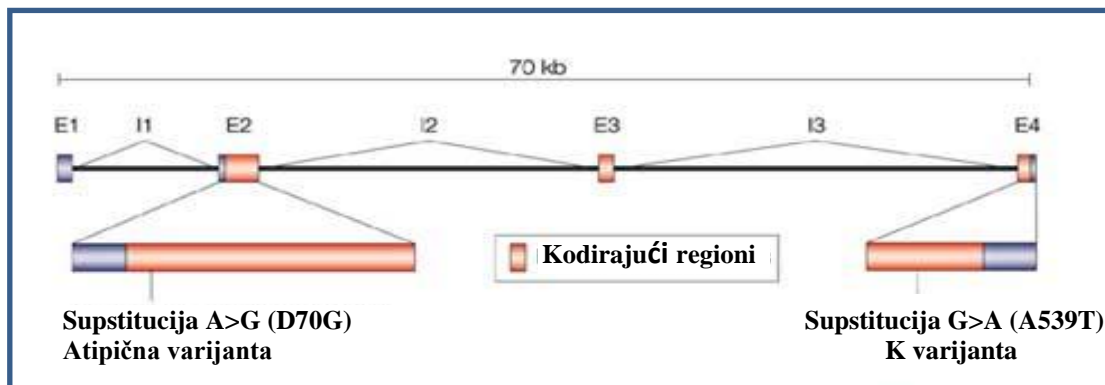
Humana butirilholin esteraza (BChE) je enzim, glikoprotein, koji pripada familiji serin esteraza. Kao i AChE, BChE pripada klasi α/β fold proteina koji sadrže centralnu β ploču okruženu α heliksima (174). Ova struktura je pronađena i kod drugih proteina, uključujući prekursore hormona kao što je tireoglobulin i ćelijske adhezione molekule (npr. neuroligin). Kompleksni ugljeni hidrati su u molekulu AChE kovalentno vezani za tri, dok su u molekulu BChE vezani za devet aminokiselinskih ostataka. Smatra se da glikozilacija utiče na savijanje, sekreciju, stabilnost i funkciju proteina (174). Veći broj mesta glikozilacije produžava poluživot BChE u odnosu na AChE. BChE se javlja u vidu različitih molekularnih formi - monomera i oligomera izgrađenih od identičnih subjedinica. Simetrična monomerna forma naziva se G1 globularna forma. Dimerna forma - G2, sastoji se od dva monomera povezana disulfidnim mostom. Dve dimerne forme povezane hidrofobnim interakcijama formiraju tetramer - G4 globularnu formu. Ove tri simetrične, hidrofobne i globularne molekularne forme javljaju se uglavnom u solubilnom obliku. Postoje i asimetrične tetramerne forme vezane za membranu kolagenskim sidrom ili membranskim sidrom bogatim prolinom-PRIMA (Slika 12) (175).



Slika 12. Molekularne forme BCHE proteina (175)

6.2. Polimorfizmi BCHE gena

U okviru gena nalazi se čak 40 polimorfnih mesta. Najčešći polimorfizam u BCHE genu je **K varijanta** (rs1803274) koja nastaje baznom supstitucijom A u G na 1699-om nukleotidu i dovodi do zamene alanina treoninom u 539-om kodonu, 36 aminokiselina uzvodno od C terminusa (176) (Slika 13.). BChE K varijanta ima smanjenu aktivnost za oko 30 % u poređenju sa wt varijantom enzima (176). Položaj polimorfizma daleko od hidrolitičkog mesta ukazuje da supstitucija dovodi do smanjene stabilnosti enzima što za posledicu ima i njegovu smanjenu aktivnost. Smatra se da će nosioci K varijante imati i zadržati bolju holinergičku transmisiju tokom godina u poređenju sa nosiocima normalnog alela što korelira sa boljom pažnjom i manjim kognitivnim propadanjem sa godinama (177). Sa druge strane nosioci K varijante su refraktorni na terapiju inhibitorima holinesteraze, trenutno vodećom terapijom AB. To povlači pitanje da li BChE K varijanta predstavlja faktor rizika ili protektivni faktor za AB (178). Dosadašnja istraživanja pokazuju da može biti protektivni faktor ali i faktor rizika u zavisnosti od uticaja ostalih varijabli.



Slika 13. Struktura i polimorfne varijante BCHE gena (175)

Atipična varijanta BChE A – nastaje supstitucijom A u G u 209 nukleotidu što dovodi do zamene aminokiseline asparagina treoninom na poziciji 70 (Slika 13.). Ova varijanta dovodi do smanjene aktivnosti enzima usled smanjenog afiniteta za estre holina. Učestalost homozigota za ovu varijantu je 1:3000. Nosioci ove varijante imaju problema nakon ingestije inhibitora holinesteraze-rostigmina. Efekti uključuju depresiju, nesanicu, gubitak težine promene u centralnom i perifernom nervnom sistemu.

Fluorid rezistentne varijante: Thr247Met i Gly390Val dovode do produžene apnee prilikom primene sukcinilholina. Homozigoti za ove varijante javljaju se sa učestalošću od 1:150000.

BChE J varijanta- dovodi do zamene glutamina valinom na poziciji 497. Posledica je snižena koncentracija a samim tim i snižena aktivnost enzima za 66%. Učestalost homozigota za ovu varijantu je 1:150000. Osobe sa ovom varijantom podložne su prolongiranoj apnei prilikom primene sukcinilholina.

BChE H varijanta - dovodi do smanjene aktivnosti enzima za 90%.

Cynthiana varijanta - dovodi do povećane koncentracije BChE

Johannesburg varijanta - dovodi do povećane aktivnosti enzima dok njegova koncentracija ostaje nepromenjena.

Postoji još oko 20 opisanih varijanti koje dovode do smanjene aktivnosti enzima na 0-2% od normalne aktivnosti.

6.3. Funkcija BChE

Biološka funkcija BChE nije u potpunosti razjašnjena. Za sada se zna da ovaj enzim katalizuje hidrolizu endogenih estara holina kao što su acetilholin, propionilholin i butirilholin kao i sekretagoga hormona rasta-oktanoil grelin (179). Pokazano je da BChE vrši hidrolizu i drugih estara kao što je kokain, acetilsalicilna kiselina i heroin. U plazmi BChE deaktivira nekoliko klasa jedinjenja koja su potencijalno štetna za normalne fiziološke funkcije. U ta jedinjenja spadaju estri, karbamati i glukoalkaloidi otkriveni u biljkama kao što su krompir, paradajz i plavi patlidžan (175). Takođe, detoksifikuje izuzetno otrovna sintetička jedinjenja kao što su različiti organofosfati. BChE je uključena i u metabolizam različitih lekova i vrši deaktivaciju sukcinilholina i konverziju bambutenola u aktivnu formu. BChE takođe ima i aril acilamidaznu aktivnost i katalizuje hidrolizu acil amida i aromatičnih amina (175).

Mnogo godina interesovanje za BChE poticalo je iz oblasti anestezije, nakon uvođenja mišićnog relaksanta sukcinilholina tokom hirurških intervencija. Otkriveno je da je BChE ključni enzim koji učestvuje u metabolizmu sukcinilholina i da osobe koje doživljavaju prolongiranu apneju imaju varijante ovog enzima sa sniženom katalitičkom aktivnošću (180).

Postojanje "silent" formi enzima kod kojih BChE nema svoju tipičnu enzimsku aktivnost bez očiglednih štetnih efekata nije činilo ovaj enzim interesantnim za detaljnija istraživanja. Termin "silent" opisuje nesposobnost te varijante da katalizuje hidrolizu estara holina. Ni jedna od studija nije ispitivala da li takvim enzimima nedostaju i druge funkcije kao što je aril acilamidazna aktivnost(175).

BChE se eksprimira u hipokampalnim, talamičkim i kortikalnim regionima za koje je poznato da imaju holinergičku inervaciju i važnu ulogu u kognitivnim funkcijama. Unutarćelijska distribucija je različita u odnosu na acetilholin esterazu. BChE se predominantno eksprimira u telu neurona i proksimalnim dendritima dok je ekspresija AChE otkrivena u jedru i aksonima. Ekspresija BChE koja se odvija na jedinstven i precizan način u određenim strukturama mozga ukazuje da bi ovaj enzim mogao imati važnu ulogu u moždanim funkcijama (179).

Pokazano je da BChE ima više specifičnih funkcija nego što se ranije verovalo. Smatra se da je BChE uključen u neke aspekte razvoja nervnog sistema i da deluje kao

koregulator holinergičke neurotransmisije (181). Strukturna sličnost između AChE i BChE sa molekulima koji učestvuju u ćelijskoj adheziji ukazuje da ovi proteini možda mogu imati i neku ne enzimsku aktivnost što bi moglo da objasni njihovu ulogu u razvoju nervnog sistema (179). Takođe, biohemijske osobine BChE se menjaju u bolestima kao što je AB. Moguća uloga u normalnim fiziološkim procesima kao i u neurodegenerativnim bolestima sve više privlači pažnju.

Primećena je ekspresija BChE u aksonima, nervnim završecima, rastućim konusima i ćelijama koje okružuju aksone što ukazuje na moguću ulogu ovog enzima u izrastanju neurita. BChE se eksprimira u velikim populacijama neurona tokom ograničenog perioda postnatalnog razvoja mozga kod nekoliko vrsta uključujući ptice, glodare, majmune i ljude. Ova privremena ekspresija u nervnim i potpornim ćelijama smatra se dokazom za ulogu ovog enzima u razvoju nervnog sistema kako svojim katalitičkim aktivnostima tako i preko sposobnosti da regulišu funkcije drugih proteina. Smatra se da AChE učestvuje u razvoju nervnog sistema i tako što povećava holinergičku transmisiju. Tek treba potvrditi da li je to slučaj i sa BChE (175).

Tradicionalna istraživanja sinaptičke plastičnosti usumerena su na promene u glutamatergičkoj transmisiji. Ipak, interakcije sa drugim tipovima neurotransmiterskih sistema kao što su holinergički, dopaminergički i GABA-ergički mogu modulisati različite aspekte plastičnosti, kao što su njen smer, trajanje i magnituda. Holinergički sistem ima ključnu ulogu u regulaciji sinaptičke transmisije i plastičnosti. Transmisija signala preko različitih subtipova muskarinskih i nikotinskih receptora, svakog sa različitim osobinama i nishodnim signalnim putevima, postavljenih na pre- i post-sinaptičkim regionima kao i van sinapsi na različitim tipovima neurona dozvoljava širok spektar modulacija. Acetilholin (ACh) je esencijalni ekscitatorni neurotransmiter u centralnom nervnom sistemu koji ima važnu ulogu u kognitivnim funkcijama. U hipokampusu ACh pojačava i inhibira sinaptičku transmisiju, olakšava i pojačava LTP i LDP i indukuje plastičnost u zavisnosti od regiona u okviru hipokampusa i uslova aktivacije receptora. Postoji nekoliko dokaza koji potvrđuju da BChE može biti koregulator aktivnosti neurotransmitera acetilholina. Regulatorna uloga BChE u hidrolizi acetilholina se primećuje kada usled inhibicije BChE dolazi do doznog zavisnog povećanja koncentracije acetilholina u mozgu (182). U slučaju odsustva AChE, BChE može da kompenzuje neke od njenih funkcija. Npr. AChE null miševi

mogu da prežive uz posebnu negu i da zadrže svoje holinergičke neurone u slučaju da imaju normalnu aktivnost BChE (183). Uzevši u obzir činjenicu da je inhibicija i BChE i AChE letalna usled holinergičke prekomerne aktivnosti smatra se da BChE ima ključnu ulogu u hidrolizi acetilholina kod AChE null životinja (183). Pokazalo se da postoji asocijacija BChE sa drugim proteinima kao što je albumin, transferin i peptidaze. Noviji rezultati ukazuju da postoji asocijacija između BChE i tripsina i da BChE značajno povećava proteolitičku aktivnost tripsina, na dozno-zavisani način. Ova zapažanja su od značaja za razumevanje funkcionisanja nervnog sistema jer tripsin ima važnu ulogu u normalnim moždanim funkcijama a smatra se da može biti uključen i u patologiju AB (184).

Na osnovu neuroanatomskih i neurohemijskih saznanja možemo pretpostaviti da između osoba sa normalnom i osoba sa smanjenom aktivnošću ovog enzima može postojati razlika u kognitivnim sposobnostima. (179) Inhibicija BChE rivastigminom asocirana je sa poboljšanjem pažnje i epizodičke memorije. Izmenjen nivo aktivnosti BChE inhibitorima ili usled postojanja određenih polimorfizama mogu uticati na kognitivne funkcije kod AB ili demencije sa Lewy-evim telima.

6.4. Uloga BChE u Alchajmerovoj bolesti

Važna uloga Ach u memorijskim funkcijama je najbolje ilustrovana kod AB, gde je deficit u pažnji, učenju i radnoj memoriji praćen redukcijom holinergičkih projekcija i receptora u korteksu i hipokampusu. Za razliku od AChE, aktivnost BChE raste sa godinama kao i kod pacijenata sa AB. Visoka koncentracija ovog enzima uočena je u neurofibrilarnim klubadima i amiloidnim plakovima (185). Interesantno je zapažanje da molekularna forma BChE koja se javlja u AB odgovara onoj koja postoji tokom embrionalnog razvića. Predominantna forma tokom razvića mozga je G1 dok je u adultnom mozgu zastupljena forma G4. Nivo G1 forme se značajno povećava u cerebralnom korteksu osoba sa AB i uočena je pozitivna korelacija sa brojem plakova u korteksu. Moguće je da reverzija u G1 formu sa izmenjenim biohemijskim osobinama može imati ulogu u ovom neurodegenerativnom poremećaju (186). BChE istih osobina kao enzim prisutan u neurofibrilarnim klubadima i plakovima prisutan je u glijalnim ćelijama (187) što ukazuje da je ovaj tip ćelija značajno uključen u procese koji su

karakteristični za ovo neurodegenerativno stanje i mogu biti izvor ovog enzima. U korteksu osoba obolelih od AB broj BChE pozitivnih plakova značajno je veći nego u korteksu zdravih starijih osoba koje imaju mali broj difuzno raspoređenih plakova. Aktivnost BChE uočena je samo u zrelim plakovima. To je navelo na pretpostavku da BChE ima značajnu ulogu u sazrevanju plakova od difuznih, benignih formi do kompaktnih, patoloških formi (188). Polimorfizmi u BChE su takođe istraživani u AB. Inicijalni izveštaji ukazuju da osobe koje nose K varijantu BChE gena i imaju ApoE4 alel imaju veći rizik da obole od AB i imaju značajno veći broj plakova u korteksu (189). Nekoliko studija je potvrdilo ove rezultate kod AB starije životne dobi dok su druge studije dobile oprečne rezultate u kojima BChE K varijanta predstavlja protektivan faktor zbog njene smanjene hidrolitičke aktivnosti (190).

CILJEVI RADA

Ispitivanje je sprovedeno sa ciljem da se u populaciji studenata:

- utvrdi učestalost alela i odgovarajućih genotipova odabranih polimorfizama gena za: APOE (rs7412/rs429358), BDNF (rs6265), KIBRA (rs17070145) i BCHE (rs1803274)
- analizira da li postoji statistički značajna povezanost utvrđenih genotipova (APOE, BDNF, KIBRA, BCHE) sa podacima dobijenim putem upitnika (uspeh u srednjoj školi i na fakultetu, lična procena o brzini pamćenja)
- analizira da li postoji statistički značajna povezanost utvrđenih genotipova (APOE, BDNF, KIBRA, BCHE) sa rezultatima testova opštih kognitivnih sposobnosti, pažnje, radne memorije i epizodičke memorije.

ISPITANICI I METODE

7. ISPITANICI

U ispitivanje je uključeno 560 studenata Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu. Za sprovedeno ispitivanje dobijena je saglasnost Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, br. 29/VI-14.

Za sve studente putem upitnika su prikupljeni podaci o godinama, polu, obrazovanju, akademskim dostignućima, obrazovanju roditelja i uslovima života. Studenti su takođe testirani primenom baterije neuropsiholoških testova koja obuhvata test opštih kognitivnih sposobnosti-Ravenove progresivne matrice (RavenPM), testove epizodičke memorije-Rejov auditivno verbalni test (RAVLT) i Wekslerova skala pamćenja, subtest logičke memorije (WMS-R) i test pažnje i radne memorije-Test ponavljanja cifara (TRC).

Kriterijumi za isključivanje iz studije bili su:

- postojanje neuroloških ili psihijatrijskih stanja koja utiču na strukturu ili funkciju mozga,
- traume glave,
- anamnestički podatak o gubitku svesti dužem od 5 min,
- korišćenje antidepresiva, anksiolitika, sedativa, antikonvulzanata, opijatnih analgetika u prethodnih 6 meseci,
- dijabetes,
- hipertenzija i
- zloupotreba psihoaktivnih supstanci.

8. METODE MOLEKULARNO-GENETIČKE ANALIZE

U ovom radu molekularno-genetičko ispitivanje obuhvata izolaciju ukupne genomske DNK, analizu polimorfizama gena za APOE, BDNF i BCHE primenom reakcije lančane polimerizacije (PCR) i restrikcione digestije PCR produkata (PCR – RFLPs metoda) dok je polimorfizam u genu za KIBRA protein analiziran primenom PCR-a u realnom vremenu standardizovanim TaqMan SNP esejom za genotipizaciju.

8.1. Izolacija DNK iz limfocita periferne krvi

Pri radu je upotrebljena DNK izolovana iz limfocita periferne krvi studenata. Za izolaciju je primenjena metoda isaljavanja ("salting out") po Milleru (191). Uzorak od 5-10 ml venske krvi sa antikoagulansom (Na-citrat, EDTA) se pomeša sa istom količinom pufera za lizu i 15 do 20 minuta drži na + 4 °C. Potom se centrifugira 15 min na 2000 obrtaja, supernatant se odbaci, a talog se resuspenduje u 5-10 ml fiziološkog pufera. Uzorak se potom centrifugira 15 min na 2000 obrtaja, a postupak ponavlja 2-3 puta dok talog ne pobeli. Nakon poslednjeg "ispiranja" supernatant se odbaci, a talogu doda 3 ml pufera A, 50 µl 10% proteinaze K i 200 µl 10% SDS (Na- dodecilsulfat). Uzorak se dobro resuspenduje i inkubira preko noći na 37 °C. Sledećeg dana se doda 1ml 6M NaCl, dobro promućka i centrifugira 15 minuta na 3000 obrtaja. Supernatant se prenosi u čistu epruvetu i centrifugira 15 minuta na 4000 obrtaja. Supernatant se pažljivo preliva u čistu graduisanu epruvetu, a zatim se doda isti volumen izopropanola. Pažljivim mućkanjem izdvaja se beličasti končić DNK. Končić se pažljivo pokupi staklenim štapićem i potopi 30 sekundi u 70 % etanolu. DNK se osuši na vazduhu, a zatim se rastvori u 300 µl redestilovane vode.

Tabela 2. Sastav navedenih pufera

Pufer za lizu*	Fiziološki pufer	Pufer A	TE pufer
0.32M SAHAROZA	0,075 M NaCl	10 mM TRIS HCl #	10 mM TRIS HCl#
10 mM TRIS HCl #	0,025 M EDTA pH 8	400 ml NaCl	1mM EDTA
1% TRITON x 100		2 mM EDTA	
5 mM MgCl ₂			

*Autoklavirati i čuvati na +4 °C, # pH 7.5

Koncentracija DNK u uzorku merena je spektrofotometrom na 260 nm, a čistoća DNK određivana je na osnovu apsorbance uzorka na 260 i 280 nm.

8.2. PCR metoda i restrikciona digestija PCR produkata (PCR-RFLPs metoda)

PCR je jednostavna, brza i prilagodljiva metoda za amplifikaciju definisane ciljane DNK sekvence u uzorku ukupne genomske DNK ili heterogene cDNK. Da bi se ostvarila selektivna amplifikacija neophodno je poznavati nukleotidni redosled ciljnog segmenta, radi sinteze specifičnih jednolančanih oligonukleotidnih graničnika-prajmera. Prajmeri su nizovi nukleotida veličine 20-30 nukleotida, komplementarni terminalnim delovima analiziranog regiona. Nakon denaturacije DNK, pošto se ostvare uslovi za hibridizaciju, prajmeri se specifično vezuju za komplementarne sekvence i ograničavaju ciljni region (ponašaju se kao RNK početnica). Prajmeri su tako konstruisani da u uslovima neophodnim za sintezu DNK i u prisustvu termostabilne DNK polimeraze i slobodnih dNTPs, iniciraju sintezu novih DNK lanaca. PCR je lančana reakcija jer novo sintetisani lanci postaju matrice za sintezu DNK u narednim ciklusima denaturacije, hibridizacije prajmera i sinteze DNK.

Reakciona smeša za PCR sadrži H₂O, dezoksinukleotid trifosfate (dNTP), pufer 10X, jone Mg⁺⁺, prajmer 1 i 2, DNK i Taq polimerazu.

Pri analizi svih polimorfizama u ovom radu 25 µl reakcione smeše za svaki uzorak sadrži:

-2,5 µl 10 x PCR pufera

-1,5 µl 25 mM MgCl₂

-0,5 µl 10 mM dNTP (smeša, 10mM svaki)

-0,5 µl prim 1 (300 ng / µl)

-0,5 µl prim 2 (300 ng / µl)

-2 µl DNK (100 ng / µl)

-0, 2 µl Taq polimeraze (5U/ µl)

-H₂O (REDE ampulirane) ad 25 µl

Reakcija se odvija kroz cikluse:

- a) Denaturacije (95°C)
- b) Hibridizacije prajmera (aniling od 52-70 °C)
- c) Sinteze novih lanaca (elongacija 72°C)

Nakon 35-40 ciklusa sinteze dobija se 10^5 ciljnih sekvenci, količina koja se lako vizuelizuje kao jedna traka definisane dužine nakon gel-elektroforeze.

PCR reakcije su izvršene u aparatu Applied Biosystems Thermal Cycler 2720. Provera ispitivanih PCR produkata vršena je nakon elektroforeze na 8% poliakrilamidnom gelu (PAA) ili 2% agaroznom gelu. Za bojenje DNK je korišćen etidijum-bromid, a gelovi su prosvetljavani na UV- transiluminatoru.

8.2.1. Analiza polimorfizma G196A (rs6265) gena za BDNF

U PCR reakciji pri ovom ispitivanju korišćeni su prajmeri koji ograničavaju region od 171bp. Sekvenca prajmera je:

Fw prajmer 5'-ACT CTG GAG AGC GTG AAT GG-3'

Rev-prajmer 5'-ACT ACT GAG CAT CAC CCT GGA-3'

Uslovi amplifikacije su:

- početna denaturacija 5 min na 95 °C
- 35 ciklusa od tri koraka
 - denaturacija 1 min na 94 °C
 - vezivanje prajmera 30 sec na 55 °C
 - ekstenzija prajmera i polimerizacija DNK 1 min na 72 °C.
- završna ekstenzija 7 min na 72 °C.

Digestija PCR produkata vršena je restrikcijom enzimom EcoRI koji prepoznaje restrikciono mesto 5'...C T T A A↓G ...3' a dobijen je iz bakterije Escherichia coli RY13. Restrikcija enzimom EcoRI se odvijala u smeši koja sadrži:

- 5 µl PCR produkta
- 5 U enzima (0.5 µl)
- 1,5 µl 10 X pufera EcoRI
- 8 µl H₂O.

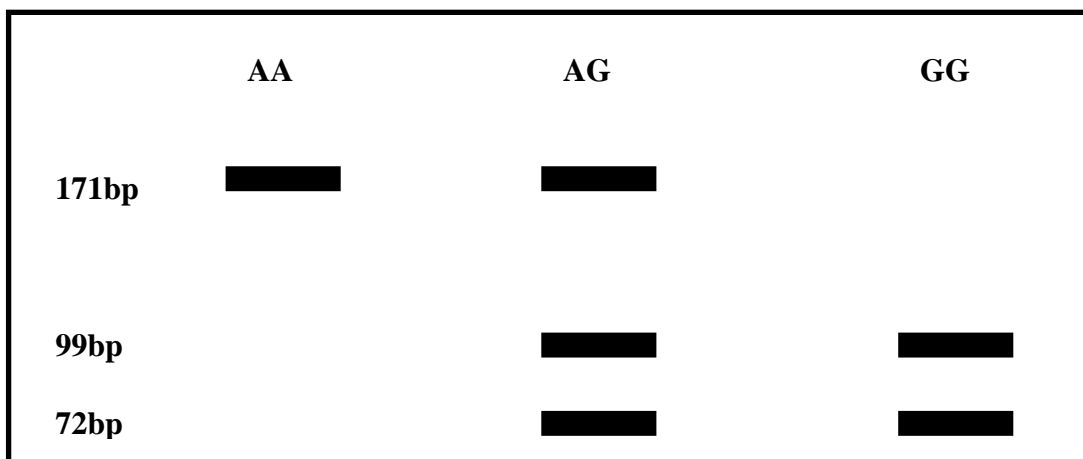
Inkubacija je trajala 3 sata na 37 °C u termostatu.

U okviru amplifikovanog dela gena za BDNF dužine 171 bp prisutno je jedno restrikciono mesto za enzim EcoRI, koje se kreira u slučaju varijante G, pa se nakon restrikcije i elektroforeze mogu uočiti fragmenti sledećih dužina: 171bp, 99 bp i 72 bp.

Vizuelizacija restrikcionih fragmenata vršena je vertikalnom elektroforezom na 8 % nedenaturišućem poliakrilamidnom gelu. Za 25 ml ovog gela neophodno je:

- 6 ml H₂O
- 2 ml TBE pufera
- 2 ml 40% akrilamida
- 70 µl APS-a (amonium persulfat)
- 13 µl TEMED-a

Vertikalna elektroforeza odvija se pri konstantnoj jačini struje (45 mA) i traje oko 45 minuta.



Slika 14. Raspored traka PCR produkta nakon digestije restrikcionim enzimom na 8% PAA gelu

Na slici 14. je prikazan raspored elektroforetski razdvojenih restrikcionih fragmenata PCR produkata dela gena za BDNF nakon digestije restrikcionom endonukleazom EcoRI.

8.2.2. Analiza polimorfizama 128/158 (rs7412/rs429358) gena za APOE

Pri PCR reakciji u ovom ispitivanju korišćeni su prajmeri koji ograničavaju region od 247 bp u kome se nalaze dva polimorfna mesta, u okviru tripleta za 112. i 158. aminokiselinu. Sekvenca prajmera je:

Fw prajmer 5'-TAA GCT TGG CAC GGC TGT CCA AGG A-3'

Rev prajmer 5'-ACA GAA TTC GCC CCG GCC TGG TAC AC-3'

Uslovi amplifikacije su:

- početna denaturacija 5 min na 94 °C
- 35 ciklusa od tri koraka
 - denaturacija 1 min na 94 °C
 - vezivanje prajmera 1 min na 65 °C
 - ekstenzija prajmera i polimerizacija DNK 1 min na 72 °C.
- završna ekstenzija 7 min na 72 °C.

Digestija PCR produkata je vršena restrikcionim enzimom Hha I (Hin 6I), koji je izolovan je iz Haemophilus influenzae. Enzim prepoznaje niz nukleotida 5'...G↓C G C...3, i vrši presecanje lanca na naznačenom mestu. Restrikcija enzimom Hha I se odvijala u restrikcionoj smeši koja sadrži:

-20 µl PCR produkta

-5 U enzima (0.5 µl)

- 2 µl 10 X pufera Tango i vode 7.5 µl.

Inkubacija je trajala 16 sati na 37 °C u termostatu.

U okviru 247 bp amlifikovanog dela gena za apoE nalazi se veći broj restrikcionih mesta, ali su samo dva polimorfna. Nakon restrikcije i elektroforeze mogu

se uočiti fragmenti sledećih dužina: 91 bp, 83 bp, 72 bp i 48 bp. Fragmenti dužine 19 bp i 16 bp će izaći sa gela tokom elektroforeze, a fragment dužine 35 bp se može uočiti ali nije značajan za detekciju analiziranih alela.

Alel APOE2	91 bp, 83 bp	(38, 19 i 16 bp)
Alel APOE3	91 bp, 48bp, 35 bp	(38, 19 i 16 bp)
Alel APOE4	72 bp, 48bp 35 bp	(38, 19 i 16 bp)

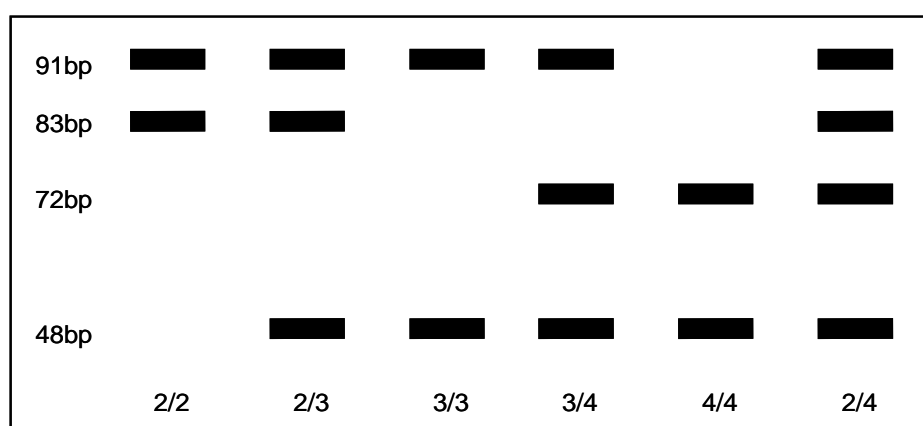
Vizuelizacija fragmenata dobijenih digestijom vrši se elektroforezom na 10% nenedenaturišućem poliakrilamidnom gelu. Za 35 ml ovog gela neophodno je:

-19.25 ml H₂O

-7 ml TBE pufera

-8.75 ml 40% akrilamida

Vertikalna elektroforeza odvija se pri konstantnoj jačini struje (45 mA) i traje oko 3 sata.



Slika 15. Raspored traka nakon digestije restrikcionim enzimom na 10% PAA gelu

Na slici 15. je prikazan raspored elektroforetski razdvojenih PCR produkata dela gena za apo E nakon digestije restrikcionom endonukleazom Hha I.

8.2.3. Analiza polimorfizma rs1803274 gena za BCHE

U ovom ispitivanju za PCR reakciju upotrebljeni su prajmeri koji ograničavaju region od 381 bp u kome se nalaze dva restrikciona mesta (jedno polimorfno). Sekvenca prajmera je:

Fw-prajmer 5'-AAG TGG GTC AAG AAA AGA GCA-3'

Rev-prajmer 5'-TGC TTT CCA CTC CCA TTC AG-3'

Uslovi amplifikacije su:

- početna denaturacija 3 min na 95 °C
- 35 ciklusa od tri koraka
 - denaturacija 1 min na 94 °C
 - vezivanje prajmera 1 min na 55 °C
 - ekstenzija prajmera i polimerizacija DNK 1 min na 72 °C.
- završna ekstenzija 7 min na 72 °C.

Digestija PCR produkata je vršena restrikcionim enzimom AluI, izolovanim iz bakterije *Arthrobacter luteus*. Ovaj enzim prepoznaje restrikciono mesto koje sadrži 5'..A G.↓C T ...3' redosled nukleotida. Reakciona smeša za digestiju se sastoji od:

-10 µl PCR produkta

-5 U enzima (0.5µl)

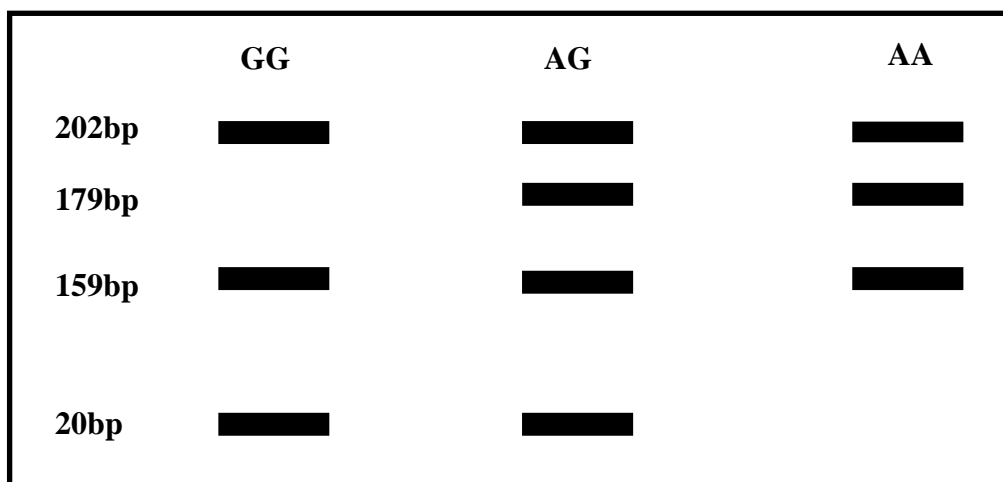
- 1.5 µl 10X pufera Tango i 8 µl vode.

Inkubacija je trajala 3 sata na 37 °C u termostatu.

U okviru 381 bp amplifikovanog dela gena za BCHE nalazi se polimorfno restrikciono mesto. Nakon restrikcije i elektroforeze mogu se uočiti fragmenti sledećih dužina: 202 bp, 179 bp, 159 bp i 20 bp.

Analiza produkata digestije usledila je nakon elektroforeze u 8% PAA gelu, imajući u vidu da: Homozigoti genotipa GG poseduju tri fragmenta - 202 bp, 159 bp i 20 bp;

heterozigoti genotipa GA, poseduju četiri fragmenta- 202 bp, 179 bp, 159 bp i 20 bp;
 homozigoti za BCHE K varjantu, genotipa AA, poseduju dva fragmenta-202bp i 179
 bp.

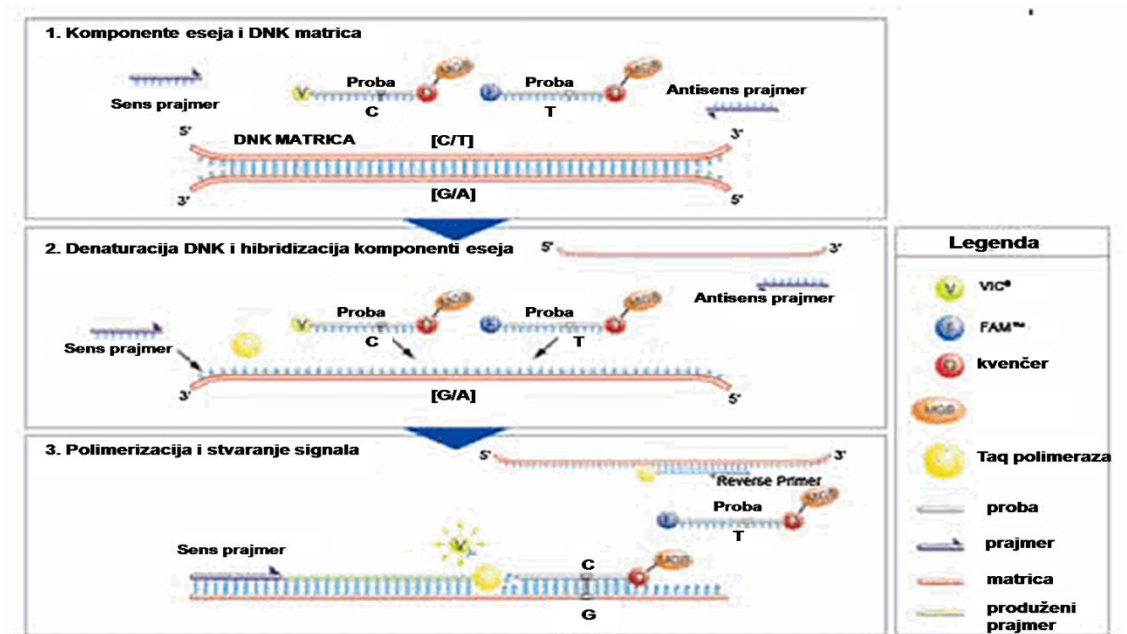


Slika 16. Raspored traka nakon digestije restrikcionim enzimom na 8% PAA gelu

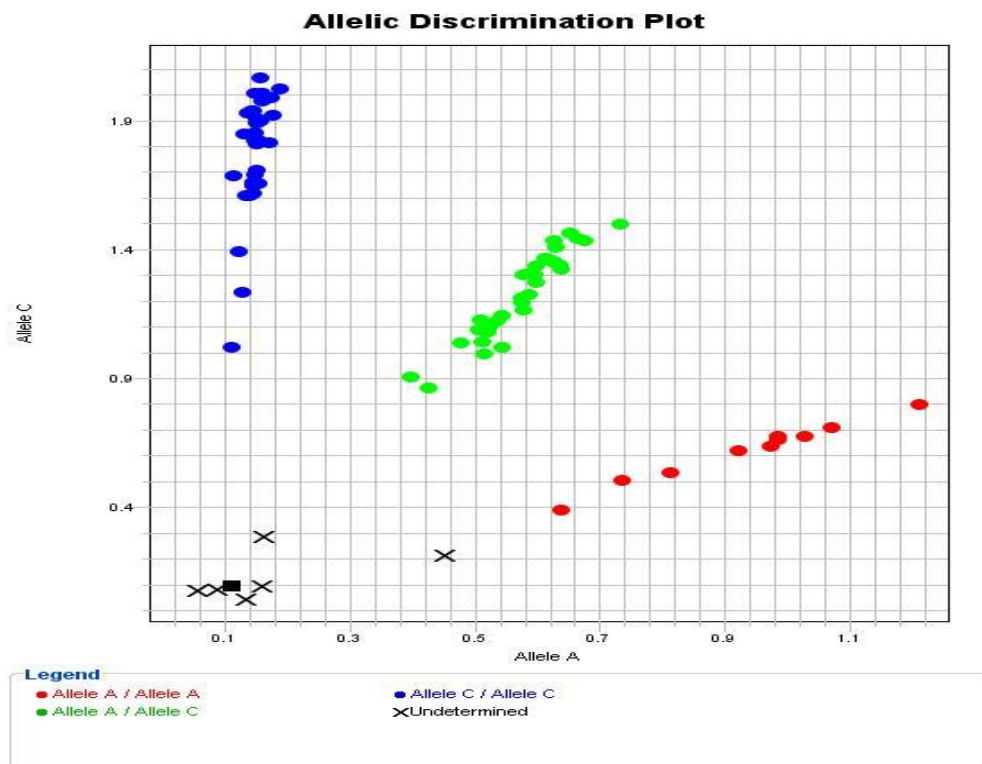
8.3. PCR u realnom vremenu (Real Time PCR)

Jedna od metoda za detekciju SNP-ova jeste i PCR u realnom vremenu sa primenom TaqMan eseja. PCR u realnom vremenu (kvantitativni PCR) predstavlja modifikaciju konvencionalnog PCR-a u gde se dinamika amplifikacije meri u realnom vremenu nakon svakog PCR ciklusa. U PCR reakciji koriste se, pored prajmera, i alel specifične oligonukleotidne probe koje su na 5' kraju obeležene različitim fluorescentnim bojama (reporter boje npr. VIC, FAM) dok se na njihovom 3' kraju nalazi prigušivač (quencher) koji blokira emisiju fluorescencije. Tokom PCR reakcije u fazi vezivanja prajmera po principu komplementarnosti se za ciljnu sekvencu DNK vezuje i jedna od proba. Nakon toga, u fazi kada Taq polimeraza dodaje nove nukleotide dolazi do uklanjanja probe 5'-3' egzonukleaznom aktivnošću enzima. Kako se najpre odvajaju 5' nukleotid sa reporterom, usled njegovog udaljavanja od prigušivača boja počinje da fluorescira, što aparat registruje. Iz ciklusa u ciklus raste intenzitet fluorescencije, što omogućava da se u realnom vremenu prati dinamika PCR reakcije. Na kraju PCR reakcije detektovano značajno povećanje fluorescencije samo jedne od boja ukazuje na homozigotno stanje za dati alel, dok povećanje fluorescencije obe boje

ukazuje na heterozigotno stanje. Prednost ove metode leži u činjenici da se celokupna analiza obavlja u jednoj tubi tokom jedne PCR reakcije bez potrebe za daljom obradom uzorka. Istovremeno se može vršiti analiza 96 ili 384 uzorka u zavisnosti od tipa nosača. Rezultate obrađuje softver i prikazuje ih u vidu tabele.



Slika 17. Komponente TaqMan eseja i ciklusi RT-PCR-a (192)



Slika 18. Rezultati SNP analize primenom TaqMan eseja

8.3.1. Analiza polimorfizma rs 17070145 gena za KIBRA protein

Za analizu ovog polimorfizma 25 μ l reakcione smeše za svaki uzorak sadrži:

-12,5 μ l TaqMan Universal PCR Master mix (2X) No AmpErase UNG

-1,25 μ l 20X SNP Genotyping Assay

-1 μ l DNK (1-20 ng / μ l)

-H₂O (REDE ampulirane) do 25 μ l

Uslovi amplifikacije su:

- aktivacija AmpliTaq Gold enzima 10 min na 95 °C
- 40 ciklusa od dva koraka
 - denaturacija 15sec na 92 °C
 - vezivanje prajmera, ekstenzija prajmera i polimerizacija DNK 1 min na 60 °C
- završna ekstenzija 7 min na 72 °C.

Real-Time PCR reakcije su izvršene u aparatu 7300 Applied Biosystems.

9. NEUROPSIHOLOŠKA BATERIJA TESTOVA

Testovi epizodičke memorije

Rey-ov test audio-verbalnog učenja (Rey AVLT) (193) je mera neposrednog pamćenja verbalnog nepovezanog materijala. Sastoji se od liste od 15 reči koja se ispitaniku čita 5 puta. Nakon svakog čitanja ispitanik treba da ponovi što veći broj reči sa liste. Rezultat u svakom pokušaju je broj tačno reprodukovanih reči na osnovu čega se izračunava ukupan broj ponovljenih reči kroz 5 pokušaja (Reycum). Na ovaj način dobija se skor neposrednog upamćivanja. Nakon 30 min ispitanici još jednom ponavljaju reči. Broj ponovljenih reči predstavlja skor odloženog slobodnog prisećanja (Reydel).

Wechslerova skala pamćenja, revidirana forma (WMS-R) subtest logičke memorije – Standardizaciju za našu populaciju izvršili su 1991. god. Berger, Mirković i Matić. Subtest se sastoji od dve kratke priče (A i B) koje ispitivač čita ispitaniku a kojima se meri neposredno pamćenje logički povezanog materijala. Nakon čitanja jedne priče ispitanik ponavlja sve pojmove kojih se može setiti. Izračunava se zajednički skor za obe price neposredno nakon čitanja (A&Bimm) i zajednički skor odloženog prisećanja pojmova nakon 30 min (A&Bdel) (194).

Test pažnje/radne memorije

Test merenja raspona cifara (TRC)– Ispitaniku se prezentuju nizovi cifara koje on treba da poređa po rastućem redosledu. Nizovi cifara koji treba da se zapamte povećavaju se za jednu cifru od 2 do 8. Za svaku dužinu niza cifara postoje dva pokušaja. Ispitivanje se prekida kada ispitanik ne reprodukuje ispravno niz iz dva pokušaja iz bilo koje serije. Pokušaj pri određenoj dužini niza ocenjen je sa 1 za jedan uspešno ponovljen niz odnosno sa 2 za dva ponovljena niza određene dužine. Broj poena koje ispitanik postigne tretira se kao njegova mera raspona za cifre (Digit span-OT). Takođe izračunava se maksimalni raspon kao dužina poslednjeg reprodukovanog niza umanjena za 0.5 ukoliko je samo jedan pokušaj bio uspešan (Digitmax-OT) (195).

Test za procenu opštih kognitivnih sposobnosti

Ravenove progresivne matrice (RavenPM) su neverbalni test za ispitivanje inteligencije. Autor testa je J. C. Raven, a test je konstruisan 1936. godine. Sastoji od 60 zadataka koji su podijeljeni u pet serija (A, B, C, D i E) sa po dvanaest zadataka, koji unutar svake serije idu od lakših ka težim. Ukupno ima 60 zadataka s maksimalnim brojem bodova 60. Može se primjenjivati individualno ili grupno, a namijenjen je populaciji od 10 godina na dalje (196).

10. STATISTIČKE METODE

Atributivne varijable prikazane su brojevima i procentima a kontinualne varijable srednjim vrednostima i standardnim devijacijama. X^2 test korišćen je za procenu razlika u polu, obrazovanju roditelja, uslovima života i sposobnosti učenja u zavisnosti od genotipa. Studentov t-test ili Mann-Withney U test; one-way ANOVA ili Kruskal-Wallis test korišćeni su za procenu razlike u godinama, rezultatima testova kognitivnih sposobnosti i prosečne ocene u srednjoj školi i na fakultetu u zavisnosti od genotipova.

Za izbor jedne varijable (predstavnik) kognitivnog testa koristili smo faktorsku analizu sa metodom glavnih komponentata kao metodom ekstrakcije i Pirsonove koeficijente linearne korelacije. Kriterijumi su bili jaka korelacija i distribucija u jednoj ključnoj komponenti.

Za predviđanje rezultata testova u zavisnosti od genotipa sa i bez prilagođavanja na osnovne demografske i socioekonomske varijable korišćena je linearna analiza. Multipla linearna regresiona analiza je korišćena za ispitivanje linearne asocijacije između rezultata testova memorijskih sposobnosti kao zavisnih varijabli i genotipa kao nezavisnih varijabli sa prilagođavanjem na pol, obrazovanje roditelja i uslova života. Odnos između prosečne ocene u srednjoj školi i na fakultetu kao zavisne varijable i rezultata testova memorijskih sposobnosti kao i genotipa kao nezavisnih varijabli procenjena je multiplim linearnim regresionim modelom. Multipla logistička regresija korišćena je za procenu odnosa između sposobnosti učenja kao zavisne varijable i rezultata testova memorijskih sposobnosti i genotipova kao nezavisnih varijabli. Primenjena su dva modela regresije, "genotipski" i "alelski". Genotipski omogućava procenu efekata genotipa, a alelski procenu efekata pojedinačnih alela na variranje u rezultatima testova memorijskih sposobnosti.

Za sve statističke analize korišćen je SPSS softver, verzija 17.0 (SPSS, Chicago, IL, USA, 2009). P vrednosti <0.05 smatrane su statistički značajnim.

REZULTATI

Ispitivanje je obuhvatilo 560 studenata Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu. Na osnovu kriterijuma za isključivanje 12 studenata je isključeno iz studije. Među 548 studenata 366 (66.8%) je devojaka i 182 (33.2%) mladića, prosečne starosti 20 ± 0.86 god. Za sve studente putem upitnika prikupljeni su podaci o uslovima života, obrazovanju oca i majke, uspehu u srednjoj školi i na fakultetu, o tome koliko puta ponavljaju gradivo pre izlaska na ispit kao i o ličnoj proceni brzine kojom pamte gradivo. Takođe, analizirani su i rezultati koje su studenti postigli na testu Ravenovih progresivnih matrica za procenu opštih kognitivnih sposobnosti i testovima memorijskih sposobnosti: TRC za procenu pažnje/radne memorije i Rey-AVLT i WMS-R subtest logičke memorije za procenu epizodičke memorije. Dobijeni rezultati analizirani su ukupno za sve studente i po polovima.

Testovi memorijskih sposobnosti: TRC, Rey-AVLT i WMS-R subtest logičke memorije podrazumevaju veći broj merenja. U cilju dobijanja odgovarajuće vrednosti koja najbolje predstavlja sva izvršena merenja primenjena je faktorska analiza sa metodom glavnih komponentata i koeficijenti Pirsonove linearne korelacije. Za sve subtestove određena je jedna komponenta koja objašnjava 92.2% varijanse u slučaju TRC testa, 62.9% za Rey-AVLT test i 91.5% varijacije u WCH-R subtestu logičke memorije. Pirsonovi koeficijenti korelacije kreću se između 0.601-0.841 za Rey-AVLT, 0.96 za TRC i 0.83 za subtest logičke memorije. Na osnovu dobijenih rezultata, merenja koja reprezentuju svaki od primenjenih testova su: TRCmax ($r=0.960$), REYcum ($r=0.986$) i WMS-R ABimm ($r=0.956$) i uključena su u dalju analizu.

11. ANALIZA PODATAKA DOBIJENIH IZ UPITNIKA

Podaci dobijeni putem upitnika pokazuju da je najveći broj studenata svoje uslove života procenio kao vrlo dobre (42.8%). Najveći broj majki studenata ima završenu srednju školu (42.5%) dok je najveći broj očeva fakultetski obrazovan (46.7%). 60.9% studenata je svoju sposobnost učenja procenilo kao brzu. Prosečna ocena studenata ostvarena u srednjoj školi je izuzetno visoka i iznosi 4.81 ± 0.41 dok prosečna ocena postignuta na fakultetu iznosi 8.49 ± 1.06 . Studenti su procenili da materijal za ispit u proseku prelaze 2.88 ± 1.04 puta. Dobijeni podaci o obrazovanju

roditelja i uslovima života studenata na osnovu njihove lične procene ukupno i grupisani po polovima prikazani su u tabeli 3.

Tabela 3. Obrazovanje roditelja i uslovi života studenata ukupno i po polovima

	devojke	mladići	ukupno	značajnost razlike
obrazovanje majke				
osnovna škola	15 (4.2%)	3 (1.7%)	18 (3.3%)	X ² =8.032 df=3 p=0.045
srednja škola	164 (45.6%)	66 (36.5%)	230 (42.5%)	
viša škola	53 (14.7%)	29 (16.0)	82 (15.2%)	
fakultet	128 (35.6%)	83 (45.9%)	211 (39.0%)	
obrazovanje oca				
osnovna škola	9 (2.5%)	2 (1.1%)	11 (2.0%)	X ² =2.132 df=3 p=0.546
srednja škola	134 (37.3%)	60 (33.5%)	194 (36.1%)	
viša škola	53 (14.8%)	29 (16.2%)	82 (15.2%)	
fakultet	163 (45.4%)	88 (49.2%)	251 (46.7%)	
uslovi života				
loši	15 (4.2%)	7 (3.9%)	22 (4.1%)	X ² =0.751 df=3 p=0.861
dobri	91 (25.3%)	47 (26.4%)	138 (25.7%)	
vrlo dobri	158 (44.0%)	72 (40.4%)	230 (42.8%)	
odlični	95 (26.5%)	52 (29.2%)	147 (27.4%)	

Statistička analiza podataka primenom X² testa pokazala je da:

-postoji statistički značajna razlika između analiziranih grupa mladića i devojaka u obrazovanju njihovih majki (p=0.045). Statistički značajno više obrazovanje imaju majke mladića u odnosu na majke devojaka.

-nema statistički značajne razlike između analiziranih grupa mladića i devojaka u obrazovanju njihovih očeva

- nema statistički značajne razlike između analiziranih grupa mladića i devojaka u uslovima života

U tabeli 4. prikazani su podaci o uspehu studenata u srednjoj školi i na fakultetu izraženi u vidu prosečne ocene±SD kao i prosečan broj ponavljanja gradiva±SD prilikom priremanja ispita.

Tabela 4. Prosečna ocena±SD studenata postignuta u srednjoj školi i na fakultetu i prosečan broj ponavljanja materijala za ispit±SD ukupno i po polovima

	broj	pol		značajnost razlike
uspeh u srednjoj školi	543	U	4.81±0.41	p=0.000
	180	M	4.70±0.50	
	363	Ž	4.86±0.35	
uspeh na fakultetu	548	U	8.49±1.06	p=0.816
	182	M	8.53±0.99	
	366	Ž	8.49±1.06	
broj ponavljanja	531	U	2.88±1.04	p=0.801
	176	M	2.85±1.04	
	355	Ž	2.90±1.04	

Analiza uspeha postignutog u srednjoj školi i na fakultetu primenom Mann-Whitney testa pokazala je da:

-postoji statistički značajna razlika između analiziranih grupa devojaka i mladića u prosečnoj oceni postignutoj tokom srednje škole (p=0.000). Prosečna ocena u srednjoj školi bila je statistički značajno viša kod devojaka nego kod mladića.

- nema statistički značajne razlike između analiziranih grupa mladića i devojaka u prosečnoj oceni postignutoj na fakultetu niti u broju ponavljanja materijala prilikom pripremanja ispita.

U tabeli 5. prikazana je lična procena studenata o brzini njihovog učenja.

Tabela 5. Lična procena studenata o brzini pamćenja gradiva

	devojke	mladići	ukupno	značajnost razlike
Učenje				
brzo	216 (60.0%)	111 (62.4%)	327 (60.8%)	p=0.598
sporo	144 (40.0%)	67 (37.6%)	211 (39.2%)	

Statistička analiza je pokazala da:

- nema statistički značajne razlike između analiziranih grupa mladića i devojaka u njihovoj proceni brzine učenja.

12. ANALIZA REZULTATA TESTOVA OPŠTIH KOGNITIVNIH I MEMORIJSKIH SPOSOBNOSTI

U tabeli 6. prikazani su rezultati koje su studenti postigli na testovima memorijskih sposobnosti TRCmax, Reycumm, ABimm i testu opštih kognitivnih sposobnosti RavenPM. Rezultati su prikazani za celu populaciju studenata i po polovima.

Tabela 6. Prosečne vrednosti \pm SD rezultata postignutih na testovima opštih kognitivnih i memorijskih sposobnosti ukupno i po polovima

	broj	pol		značajnost razlike
TRCmax	545	U	7.35 \pm 0.77	p=0.034
	181	M	7.42 \pm 0.76	
	364	Ž	7.31 \pm 0.78	
Reycumm	543	U	61.27 \pm 6.17	p=0.000
	180	M	59.73 \pm 6.63	
	363	Ž	62.05 \pm 5.66	
RavenPM	548	U	49.67 \pm 5.36	p=0.018
	182	M	50.47 \pm 5.34	
	366	Ž	49.28 \pm 5.34	
ABimm	545	U	36.25 \pm 5.53	p=0.347
	180	M	36.06 \pm 5.77	
	365	Ž	36.41 \pm 5.40	

Analiza rezultata postignutih na testovima memorijskih sposobnosti prikazanih u tabeli 6. primenom Mann-Whitney testa pokazala je da:

- postoji statistički značajna razlika između analiziranih grupa mladića i devojaka u prosečnim rezultatima postignutim na testu TRCmax (p=0.034). Mladići su postigli statistički značajno bolje rezultate na TRCmax testu u poređenju sa devojkama.

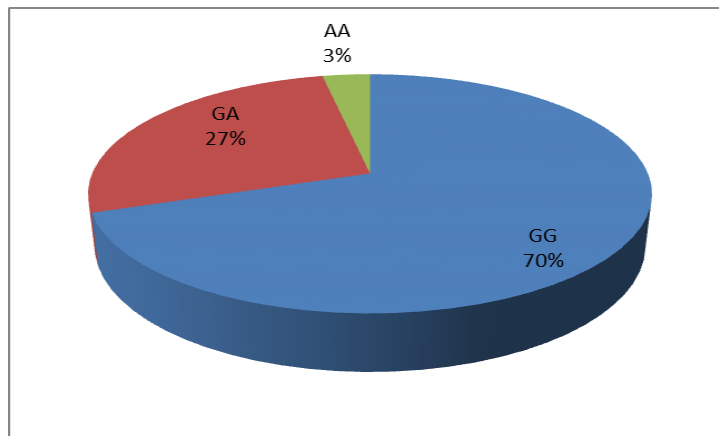
- postoji statistički značajna razlika između analiziranih grupa mladića i devojaka u prosečnim rezultatima postignutim na REYcum testu ($p=0.000$). Devojke su postigle statistički značajno bolje rezultate.
- postoji statistički značajna razlika između analiziranih grupa mladića i devojaka u prosečnim rezultatima postignutim na testu opštih kognitivnih sposobnosti ($p=0.018$). Mladići su postigli statistički značajno bolje rezultate na RavenPM testu.
- nema statistički značajne razlike između analiziranih grupa mladića i devojaka u rezultatima postignutim na testu epizodičke memorije WMS-R ABimmed

12.1. Rezultati molekularno-genetičkih analiza – BDNF rs6265 genotip

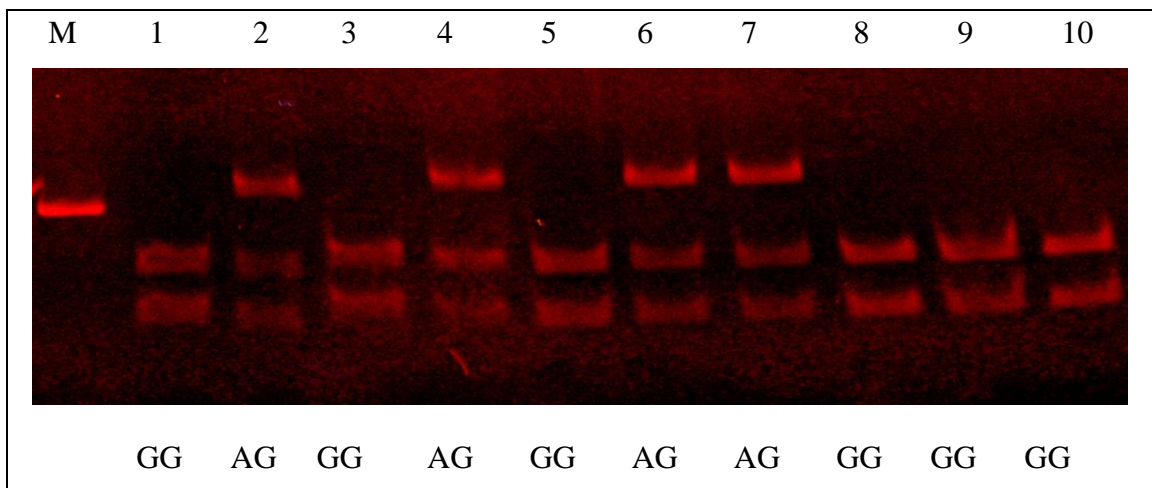
Učestalost BDNF (Val66Met) genotipova

Analizom je obuhvaćeno 530 studenata. Utvrđeno je da je 370 studenata tj. 69.8% homozigot za češći alel G (genotip GG), 143-oro tj. 27.0% su heterozigoti (genotip GA) a svega njih 17 (3.2%) je homozigot za ređi alel A (genotip AA). Dobijeni rezultati prikazani su na grafikonu 4.

Grafikon 4. Učestalost BDNF genotipova u populaciji studenata



Na slici 19. je prikazana fotografija gela nakon digestije PCR produkata restrikcijom enzimom.



Slika 19. Polimorfizam BDNF (Val66Met)-izgled traka na gelu nakon digestije restrikcionim enzimom

Na osnovu učestalosti genotipova izračunate su učestalosti alela G i A. Učestalost alela G je 83.3%, a alela A 16.7%.

Kod mladića učestalost GG genotipa je 70.0%, GA genotipa 28.3% a AA genotipa 1.7%. Učestalost GG genotipa kod devojaka je 69.7%, GA genotipa 26.3% a AA genotipa 4%. Razlika učestalosti genotipova između devojaka i mladića nije statistički značajna ($p=0.543$). Učestalost genotipova prema polu prikazana je na grafikonu 5.

Grafikon 5. Učestalost BDNF genotipova po polu

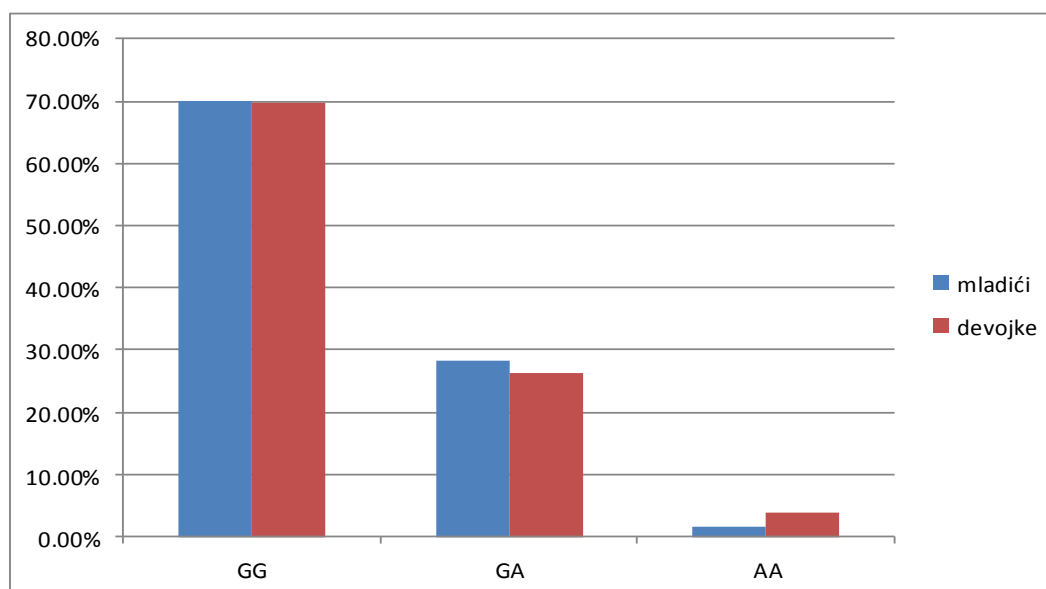


Tabela 7. Demografske, socioekonomske i memorijske karakteristike u populaciji studenata u zavisnosti od njihovog BDNF genotipa.

	GG	GA	AA	Ukupno	p
N	370	143	17	530	
Starost (godine)	20.2 ± 0.83	20.4 ± 0.82	20.2 ± 0.66	20.3 ± 0.82	
Žene / Muškarci	246/124	93/50	14/3	353/177	0.543
Obrazovanje majke (%)					
osnovna škola	12 (3.2)	4 (2.8)	1 (5.9)	17 (3.2)	
srednja škola	164 (44.3)	53 (37.1)	9 (52.9)	226 (42.6)	
viša škola	53 (14.3)	28 (19.6)	1 (5.9)	82 (15.5)	
fakultet	140 (37.8)	58 (40.6)	6 (35.3)	204 (38.5)	
Obrazovanje oca (%)					
osnovna škola	8 (2.2)	3 (2.1)	1 (5.9)	12 (2.3)	
srednja škola	132 (35.7)	51 (35.7)	7 (41.2)	190 (35.8)	
viša škola	54 (14.6)	24 (16.8)	2 (11.8)	80 (15.1)	
fakultet	173 (46.8)	64 (44.8)	7 (41.2)	244 (46.0)	
Uslovi života					
loši	15 (4.1)	7 (4.9)	0 (0.0)	22 (4.2)	
dobri	84 (22.7)	50 (35.0)	3 (13.7)	137 (25.8)	
vrlo dobri	157 (42.4)	57 (39.9)	8 (47.1)	222 (41.9)	
odlični	110 (29.7)	29 (20.3)	6 (35.3)	145 (27.3)	
Prosečna ocena u srednjoj školi	4.79±0.43	4.83±0.37	5.00±0.00	4.81±0.41	0.108
Prosečna ocena na fakultetu	8.50±1.06	8.47±1.04	8.25±1.09	8.49±1.05	0.823
Broj ponavljanja gradiva	2.93±1.08	2.80±1.00	2.76±0.90	2.89±1.05	0.556
Sposobnost učenja					
brza	226 (61.1)	86 (61.0)	10 (58.8)	321 (60.9)	0.744
spora	144 (38.9)	55 (39.0)	7 (41.2)	206 (39.1)	
Opšte kognitivne sposobnosti					
RavenPM	49.53±5.52	49.85±5.88	49.47±4.59	49.61±5.58	0.488
Pažnja/radna memorija					
TRC	9.99 ± 1.84	9.94 ± 1.92	10.05± 1.29	9.98± 1.84	0.661
Epizodička memorija					
Reycumm	61.05±6.02	61.61±6.65	62.82±6.37	61.26±6.20	0.125
WMS-R ABimm	35.97±5.56	36.96±5.39	36.47±5.88	36.26±5.53	0.092

U Tabeli 7. prikazani su demografske, socioekonomske i memorijske karakteristike studenata u zavisnosti od BDNF genotipa.

Analiza dobijenih rezultata je pokazala da:

-nema statistički značajne razlike u demografskim, socioekonomskim varijablama, brzini učenja kao i rezultatima postignutim na testovima opštih kognitivnih i memorijskih sposobnosti

Nakon ove analize rezultate opštih kognitivnih i memorijskih sposobnosti grupisali smo po polovima i u zavisnosti od prisustva alela A (Tabela 8.).

Tabela 8. Rezultati testova opštih kognitivnih i memorijskih sposobnostiu zavisnosti od prisustva A alela grupisani po polovima

	genotip	broj	mladići	p	broj	devojke	p
TRCmax	GG	125	7.43±0.74		249	7.29±0.80	
	GA	52	7.38±0.82	0.311	103	7.34±0.78	0.557
RavenPM	GG	125	50.38±5.18		149	49.22±5.23	
	GA	52	50.65±5.90	0.474	104	49.37±5.73	0.719
REYcum	GG	125	60.11±6.39		248	61.63±5.59	
	GA	52	59.19±7.46	0.561	103	63.14±5.68	0.022
ABimm	GG	125	35.89±5.62		249	36.13±5.39	
	GA	52	36.47±5.67	0.589	104	37.21±5.18	0.102

Analiza dobijenih rezultata primenom Mann-Whitney testa je pokazala da:

-postoji statistički značajna razlika u rezultatima postignutim na Reycumm testu u grupi devojaka (p=0.022). Devojke nosioci A alela (GA genotipa) postigle su bolje rezultate u poređenju sa nosiocima GG genotipa.

-ne postoji statistički značajna razlika u rezultatima postignutim na drugim testovima ni u grupi mladića ni u grupi devojaka.

Multipla linearna regresiona analiza

Multipla linearna regresiona analiza primenjena je u cilju ispitivanja uticaja BDNF genotipa kao nezavisne varijable na rezultate koje studenti postižu na testovima memorijskih sposobnosti i opštih kognitivnih sposobnosti, kao zavisnih varijabli.

Analiza je izvršena bez prilagođavanja (tabela 9.) i nakon prilagođavanja na pol, obrazovanje roditelja i uslove života studenata (tabela 10).

Tabela 9. Rezultati regresione analize uticaja BDNF genotipa kao nezavisne varijable na rezultate postignutih na testovima kao zavisnih varijabli

Zavisne varijable	BDNF val/val vs val/met				
	constant	b	beta	p	95% CI
TRCmax	7.26	0.002	0.001	0.973	-0.08 – 0.09
REYcumm	70.38	-0.28	-0.04	0.356	-0.88 – 0.32
RAVENPM	54.79	-0.16	-0.02	0.562	-0.70 – 0.38
ABimm	52.27	-0.49	-0.08	0.070	-1.03 - 0.04

Analiza je pokazala da:

-postoji trend po kome studenti nosioci A tj. Met alela (GA genotipa) postižu bolje rezultate na Abimmed testu u odnosu na studente GG tj. Val/Val genotipa.

-ne postoji statistički značajna povezanost Met alela i rezultata koje su studenti postigli na TRCmax, REYcumm i RavenPM testovima

Tabela 10. Rezultati multiple linearne regresione analize uticaja BDNF genotipa kao nezavisne varijable prilagođene na pol, uslove života i obrazovanje roditelja na rezultate postignutih na testovima kao zavisnih varijabli.

Zavisne varijable	BDNF val/val vs val/met prilagođeno na pol, uslove života i obrazovanje roditelja				
	constant	b	beta	p	95% CI
TRCmax	7.30	-0.008	-0.008	0.862	-0.098 – 0.082
REYcumm	68.10	-0.38	-0.05	0.203	-0.98 – 0.21
RAVENPM	54.20	-0.18	-0.03	0.527	-0.72 – 0.37
ABimm	53.64	-0.57	-0.09	0.039	-1.11 - -0.03

Analiza dobijenih rezultata pokazala je da:

- postoji statistički značajna povezanost Met alela sa boljim rezultatima na ABimmed testu kada su rezultati prilagođeni na pol, uslove života i obrazovanje roditelja

-ne postoji statistički značajna povezanost Met alela sa postignutim rezultatima studenata na ostalim testovima.

Tabela 11. Rezultati analize uticaja BDNF genotipa, pola, uslova života i obrazovanja roditelja kao nezavisnih varijabli na rezultate testa TRCmax kao zavisne varijable

Nezavisne varijable	b	beta	p	95% CI
constant	7.043		.000	6.592-7.494
BDNF GG/GA	0.022	0.013	0.775	-.127-0.170
pol	-0.097	-0.058	0.184	-.241-0.046
uslovi života	0.090	0.094	0.039	.004-0.175
obrazovanje majke	0.022	0.027	0.616	-.065-0.109
obrazovanje oca	0.037	0.045	0.412	-.051-0.125

Analiza je pokazala da samo uslovi života studenata statistički značajno utiču na rezultate postignute na TRCmax testu. Uticaj BDNF genotipa i drugih nezavisnih varijabli nije statistički značajan.

Tabela 12. Rezultati analize uticaja BDNF genotipa, pola, uslova života i obrazovanja roditelja kao nezavisnih varijabli na rezultate testa REYcummm kao zavisne varijable

Nezavisne varijable	b	beta	p	95% CI
constant	54.117		0.000	50.647-57.586
BDNF GG/GA	1.029	0.078	0.076	-.109-2.167
pol	2.151	0.167	0.000	1.051-3.252
uslovi života	0.798	0.109	0.017	.146-1.450
obrazovanje majke	0.002	0.000	0.995	-.663-0.667
obrazovanje oca	-0.019	-0.003	0.956	-.696-0.658

Analiza je pokazala da samo pol i uslovi života studenata statistički značajno utiču na rezultate postignute na Reycumm testu. Uticaj BDNF genotipa i drugih nezavisnih varijabli nije statistički značajan.

Tabela 13. Rezultati analize uticaja BDNF genotipa, pola, uslova života i obrazovanja roditelja kao nezavisnih varijabli na rezultate testa RavenPM kao zavisne varijable

Nezavisne varijable	b	beta	p	95% CI
constant	48.639		0.000	45.533-51.744
BDNF GG/GA	0.353	0.030	0.497	-0.668-1.374
pol	-1.154	-0.101	0.022	-2.141-(-0.167)
uslovi života	0.397	0.061	0.183	-0.189-0.983
obrazovanje majke	0.254	0.045	0.403	-0.342-0.850
obrazovanje oca	0.180	0.032	0.559	-0.426-0.787

Analiza je pokazala da samo pol statistički značajno utiče na rezultate postignute na RavenPM testu. Uticaj BDNF genotipa i drugih nezavisnih varijabli nije statistički značajan.

Tabela 14. Rezultati analize uticaja BDNF genotipa, pola, uslova života i obrazovanja roditelja kao nezavisnih varijabli na rezultate testa ABimmed kao zavisne varijable

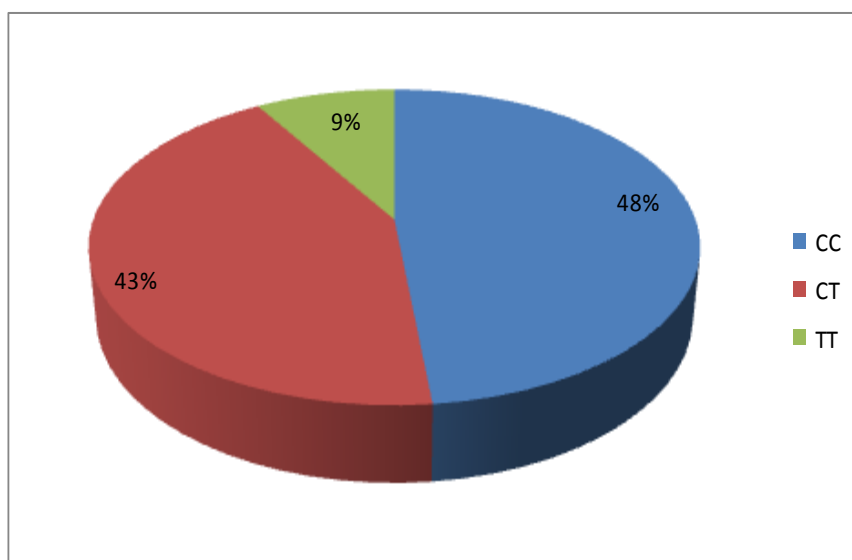
Nezavisne varijable	b	beta	p	95% CI
constant	35.215		0.000	30.951-37.241
BDNF GG/GA	-0.57	-0.09	0.039	-1.11 - -0.03
pol	0.266	0.023	0.601	-.733-1.265
uslovi života	0.466	0 .071	0.123	-.126-1.058
obrazovanje majke	-0.224	-0.040	0.466	-.828-0.380
obrazovanje oca	-0.116	-0.020	0.709	-.729-0.497

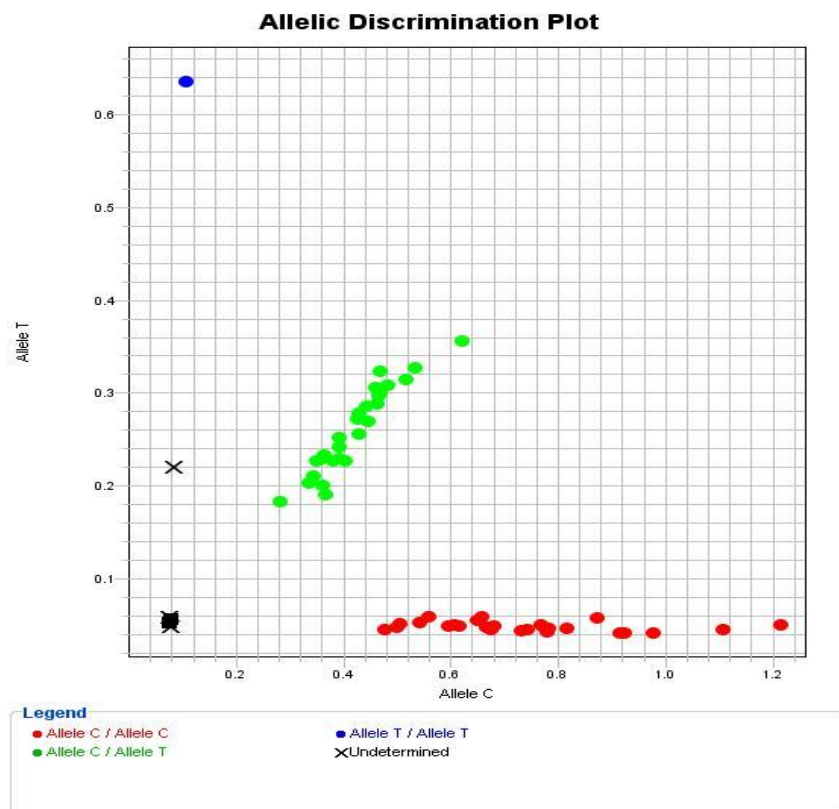
Analiza je pokazala da postoji statistički značajna povezanost BDNF genotipa i rezultata postignutih na Abimmed testu. Nosioци GA genotipa postižu statistički značajno bolje rezultate na ovom testu. Nije uočen statistički značajan uticaj ostalih varijabli.

12.2. Rezultati molekularno-genetičkih analiza-KIBRA rs17070145 genotip

Analizom je obuhvaćeno 538 studenata. Utvrđeno je da je 260 studenata tj. 48.3% homozigot za češći alel C (genotip CC), 231-oro tj. 42.9% su heterozigoti (genotip CT) a njih 47 (8.7%) je homozigot za ređi alel T (genotip TT). Dobijeni rezultati prikazani su na grafikonu 6. i na slici 20.

Grafikon 6. Učestalost KIBRA genotipova u populaciji studenata

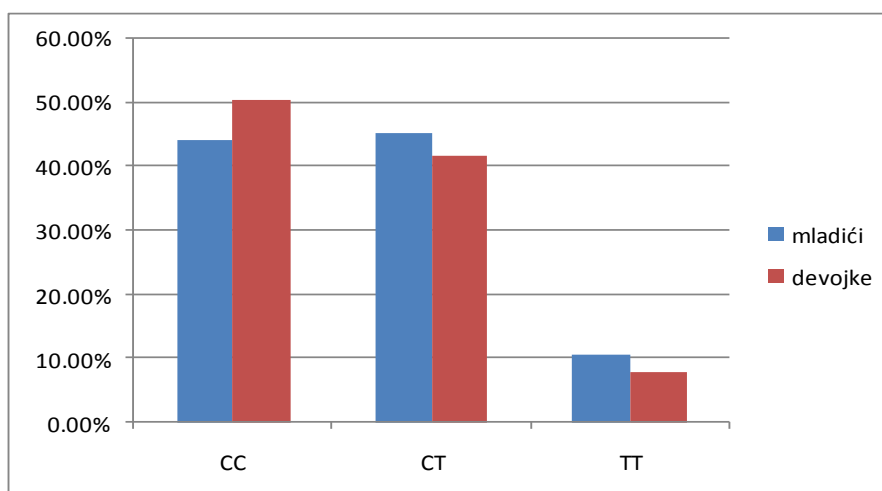




Slika 20. Rezultati genotipizacije primenom TaqMan eseja

Učestalost genotipova prema polu prikazana je na grafikonu 7. Na osnovu učestalosti genotipova izračunate su učestalosti alela C i T. Učestalost alela C je 69.8%, a alela T 30.2%.

Grafikon 7. Učestalost KIBRA genotipova po polu



Kod mladića učestalost CC genotipa je 44.1%, CT genotipa 45.3% a TT genotipa 10.6%. Učestalost CC genotipa kod devojaka je 50.4%, CT genotipa 41.8% a TT genotipa 7.8%. Razlika učestalosti genotipova između devojaka i mladića nije statistički značajna ($p=0.907$).

Tabela 15. Demografske, socioekonomske i kognitivne karakteristike u populaciji studenata u zavisnosti od njihovog KIBRA genotipa

	CC	CT	TT	Ukupno	p
N	260	231	47	538	
Starost (godine±SD)	20.25 ± 0.81	20.28 ± 0.83	20.25 ± 0.89	20.26 ± 0.83	0.907
Žene / Muškarci	181/79	150/81	28/19	359/179	
Obrazovanje majke (%)					
osnovna škola	11 (4.2)	6 (2.6)	1 (2.1)	18 (3.4)	
srednja škola	112 (43.2)	101 (43.7)	18 (38.3)	231 (43.0)	
viša škola	33 (12.7)	39 (16.9)	8 (17.0)	80 (14.9)	
fakultet	103 (39.8)	85 (36.8)	20 (42.6)	208 (38.7)	
Obrazovanje oca (%)					
osnovna škola	7 (2.7)	4 (1.7)	1 (2.2)	12 (2.2)	
srednja škola	92 (35.7)	86 (37.4)	7 (37.0)	195 (36.5)	
viša škola	40 (15.6)	34 (14.8)	2 (13.0)	80 (15.0)	
fakultet	119 (46.1)	106 (46.1)	7 (47.8)	247 (46.31)	
Uslovi života (%)					
loši	24 (9.4)	30 (13.2)	8 (17.4)	62 (11.7)	
dobri	75 (29.4)	59 (25.9)	7 (15.2)	137 (26.7)	
vrlo dobri	62 (24.3)	59 (25.9)	15 (32.6)	222 (25.7)	
odlični	94 (36.9)	80 (35.1)	16 (34.8)	145 (35.9)	
Prosečna ocena u srednjoj školi	4.82±0.38	4.77±0.45	4.80±0.41	4.80±0.41	0.378
Prosečna ocena na fakultetu	8.52±1.08	8.52±1.06	8.49±0.94	8.52±1.06	0.240
Sposobnost učenja (%)					
brza	164 (63.3)	134 (58.5)	28 (60.9)	326 (61.0)	0.554
spora	95 (36.7)	95 (41.5)	18 (39.1)	208 (39.0)	
Ponavljjanje gradiva	2.92±1.05	2.82±0.98	2.91±0.73	2.88±0.99	0.383
Opšte kognitivne sposobnosti					
RavenPM	49.36±5.55	49.92±5.20	49.66±5.08	49.63±5.36	0.669
Pažnja/radna memorija					
TRCmax	7.35±0.80	7.35±0.73	7.32±0.93	7.35±0.78	0.649
Epizodička memorija					
Reycumm	61.68±6.07	60.78±6.16	61.83±6.00	61.31±6.11	0.092
WMS-R ABimm	36.48±5.34	36.22±5.50	35.94±6.09	36.32±5.47	0.597

Analiza dobijenih rezultata je pokazala da:

-nema statistički značajne razlike u demografskim, socioekonomskim varijablama, brzini učenja kao i rezultatima postignutim na testovima opštih kognitivnih i memorijskih sposobnosti

U tabeli 16. Prikazani su rezultati dobijeni putem upitnika kao i rezultati testova memorijskih sposobnosti grupisani u zavisnosti od prisustva T alela.

Tabela 16. Demografske, socioekonomske i kognitivne karakteristike u populaciji studenata u zavisnosti od prisustva T alela

	CC	CT+TT	P
N	260	278	
Starost (godine±SD)	20.25 ± 0.81	20.28 ± 0.84	0.696
Žene / Muškarci	181/79	178/100	0.169
Prosečna ocena u srednjoj školi±SD	4.82±0.38	4.79±0.44	0.420
Prosečna ocena na fakultetu	8.52±1.06	8.51±1.06	0.925
Sposobnost učenja (%)			
brza	164 (63.3)	162 (58.5)	0.296
spora	95 (36.7)	113 (41.5)	
Ponavljjanje gradiva	2.92±1.05	2.84±0.94	0.739
Opšte kognitivne sposobnosti			
Raven- SPM	49.36±5.55	49.87±5.17	0.471
Pažnja/radna memorija			
TRCmax	7.35±0.80	7.35±0.76	0.988
Epizodička memorija			
Reycumm	61.68±6.07	60.78±6.16	0.092
WMS-R ABimm	36.48±5.34	36.17±5.59	0.918

Zatim smo analizirali rezultate dobijene na testu opštih kognitivnih i memorijskih sposobnosti u zavisnosti od KIBRA genotipa odvojeno po polovima (Tabela 17.).

Tabela 17. Srednje vrednosti rezultata testova opštih kognitivnih i memorijskih sposobnosti \pm SD u zavisnosti od KIBRA genotipa grupisani po polovima

	genotip	broj	mladići	značajnost razlike	broj	devojke	značajnost razlike
TRCmax	CC	78	7.42 \pm 0.78	1.914	180	7.32 \pm .81	0.540
	CT	81	7.44 \pm 0.78	0.384	149	7.30 \pm 0.74	0.763
	TT	19	7.32 \pm 0.96		28	7.32 \pm 0.92	
Raven PM	CC	79	49.18 \pm 6.25		4.517	181	
	CT	81	51.42 \pm 4.42	0.105	150	49.11 \pm 5.41	0.809
	TT	19	50.63 \pm 3.23		28	49.27 \pm 5.35	
Reycumm	CC	78	59.24 \pm 6.64		1.069	179	
	CT	80	60.06 \pm 6.84	0.586	149	61.16 \pm 5.76	0.012
	TT	19	60.74 \pm 6.57		28	62.57 \pm 5.58	
ABimm	CC	78	35.73 \pm 5.70		0.437	180	
	CT	80	36.30 \pm 5.54	0.804	150	36.18 \pm 5.49	0.558
	TT	19	36.27 \pm 5.55		28	35.78 \pm 6.42	

Analiza dobijenih rezultata primenom Kruskall-Wallis testa pokazala je da:

-postoji statistički značajna razlika u rezultatima postignutim na testu Reycumm u grupi devojaka.

-ne postoji statistički značajna razlika u rezultatima postignutim na drugim testovima memorijskih sposobnosti kao ni na testu opštih kognitivnih sposobnosti ni u grupi mladića ni u grupi devojaka.

Takođe, izvršena je i analiza rezultata po polovima u zavisnosti od prisustva alela T. Dobijene vrednosti prikazane su u tabeli 18.

Tabela 18. Rezultati testova opštih kognitivnih i memorijskih sposobnosti u zavisnosti od prisustva T alela grupisani po polovima

	genotip	broj	mladići	p	broj	devojke	p
TRCmax	CC	78	7.42±0.78		180	7.32±0.81	
	CT+TT	100	7.41±0.75	0.456	177	7.31±0.77	0.659
RavenPM	CC	79	49.18±6.25		181	49.45±5.22	
	CT+TT	100	51.27±4.22	0.053	178	49.09±5.49	0.522
Reycumm	CC	78	59.24±6.64		179	62.74±5.50	
	CT+TT	99	60.19±6.76	0.363	177	61.38±5.74	0.009
ABimm	CC	78	35.73±5.70		180	36.80±5.15	
	CT+TT	99	36.27±5.55	0.567	178	36.12±5.63	0.357

Analiza dobijenih rezultata primenom Mann-Whitney testa pokazala je da:

-postoji statistički značajna razlika u rezultatima postignutim na testu Reycumm u grupi devojaka. Devojke nosioci CC genotipa postigle su bolje rezultate na Reycumm testu u poređenju sa devojka nosiocima T alela (CT + TT genotipa).

-postoji statistički značajna razlika u rezultatima postignutim na testu RavenPM u grupi mladića. Mladići nosioci T alela (CT i TT genotipa) postigli su statistički značajno bolje rezultate na RavenPM testu u poređenju sa nosiocima CC genotipa.

-ne postoji statistički značajna razlika u rezultatima postignutim na drugim testovima memorijskih sposobnosti kao ni na testu opštih kognitivnih sposobnosti ni u grupi mladića ni u grupi devojaka.

Multipla linearna regresiona analiza

Multipla linearna regresiona analiza primenjena je u cilju ispitivanja uticaja KIBRA genotipa ili alela kao nezavisne varijable na rezultate koje studenti postižu na testovima memorijskih sposobnosti kao zavisnih varijabli. Analiza je izvršena bez prilagođavanja (tabela 19.) i nakon prilagođavanja na pol, obrazovanje roditelja i uslove života studenata (tabela 20.).

Tabela 19. Rezultati multiple linearne regresione analize povezanosti rezultata postignutih na testovima kao zavisnih varijabli i KIBRA genotipa kao nezavisne varijable

Zavisne varijable	KIBRA genotip				
	constant	b	beta	p	95% CI
TRCMax	7.36	-0.01	-0.05	0.909	-0.11 – 0.10
REYcumm	61.83	-0.32	-0.03	0.430	-1.13 – 0.48
RAVENPM	49.13	0.31	0.04	0.387	-0.39 – 1.02
ABimm	36.75	-0.26	-0.03	0.470	-0.99 - 0.46

Analiza rezultata je pokazala da:

-ne postoji statistički značajna povezanost između KIBRA genotipa i rezultata postignutih na primenjenim testovima

Tabela 20. Rezultati multiple linearne regresione analize povezanosti rezultata postignutih na testovima kao zavisnih varijabli i BCHE genotipa kao nezavisne varijable prilagođeno na pol, obrazovanje roditelja i uslove života

Zavisne varijable	KIBRA genotip, prilagođeno na pol, uslove života i obrazovanje roditelja				
	constant	b	beta	p	95% CI
TRCmax	7.06	0.01	0.00	0.920	-0.99 – 0.11
REYcumm	56.10	-0.14	-0.01	0.733	-0.94 – 0.66
RAVENPM	48.75	0.30	0.03	0.417	-0.42 – 1.01
ABimm	36.43	-0.17	-0.02	0.650	-0.90 – 0.56

Analiza rezultata dobijenih nakon prilagođavanja na pol, uslove života i obrazovanje roditelja pokazala je da:

-ne postoji statistički značajna povezanost između KIBRA genotipa i rezultata postignutih na ostalim testovima

Takođe, izvršena je i analiza uticaja T alela na rezultate postignute na testovima.

Tabela 21. Rezultati multiple linearne regresione analize uticaja T alela kao nezavisne varijable na rezultate postignute na testovima koji predstavljaju zavisne varijable

Zavisne varijable	KIBRA CC/CT+TT				
	constant	b	beta	p	95% CI
TRCMax	7.35	-0.00	-0.00	0.996	-0.13 – 0.13
REYcumm	62.41	-0.72	-0.06	0.172	-1.76 – 0.32
RAVENPM	48.86	0.50	0.05	0.275	-0.40 – 1.41
ABimmed	36.78	-0.30	-0.03	0.519	-1.23 - 0.62

Tabela 22. Rezultati multiple linearne regresione analize uticaja A alela kao nezavisne varijable, prilagođene na pol, uslove života i obrazovanje roditelja, na rezultate postignute na testovima koji predstavljaju zavisne varijable

Zavisne varijable	KIBRA CC/CT+TT, prilagođeno na pol, uslove života i obrazovanje roditelja				
	constant	b	beta	p	95% CI
TRCMax	7.05	0.01	0.01	0.859	-0.12 – 0.15
REYcumm	56.82	-0.57	-0.05	0.275	-1.60 – 0.46
RAVENPM	48.45	0.49	0.05	0.291	-0.42 – 1.41
ABimmed	36.17	-0.21	-0.02	0.664	-1.15 – 0.73

Analiza rezultata dobijenih nakon prilagođavanja na pol, uslove života i obrazovanje roditelja pokazala je da:

-ne postoji statistički značajna povezanost između KIBRA genotipa i rezultata postignutih na ostalim testovima

Izvršena je i analiza uticaja modifikujućih varijabli na postignute rezultate na testovima memorijskih i opštih kognitivnih sposobnosti.

Tabela 23. Rezultati multiple linearne regresione analize u kojoj su rezultati testa TRCmax zavisne varijable a KIBRA genotip, pol, uslovi života, obrazovanje roditelja nezavisne varijable

Nezavisne varijable	TRCmax zavisna varijabla			
	b	beta	p	95% CI
constant	7.064		0.000	6.620-7.507
KIBRA	0.005	0.004	0.920	-0.099-0.110
pol	-0.095	-0.057	0.196	-0.238-0.049
uslovi života	0.096	0.101	0.025	0.012-0.180
obrazovanje majke	0.014	0.017	0.756	-0.072-0.099
obrazovanje oca	0.037	0.046	0.399	-0.049-0.124

Analiza dobijenih rezultata je pokazala da:

-postoji statistički značajan uticaj uslova života na rezultate postignute na testu TRCmax. Studenti koji imaju bolje uslove života ostvarili su bolje rezultate na testu TRCmax.

-ne postoji statistički značajan uticaj pola i obrazovanja roditelja na rezultate postignute na testu TRCmax

Tabela 24. Rezultati multiple linearne regresione analize u kojoj su rezultati testa REYcumm zavisne varijable a pol, uslovi života, obrazovanje roditelja nezavisne varijable

Nezavisne varijable	REYcumm zavisna varijabla			
	b	beta	p	95% CI
constant	56.100		0.000	52.683-59.516
KIBRA	-0.139	-0.015	0.733	-0.941-0.662
pol	2.174	0.169	0.000	1.073-3.275
uslovi života	0.676	0.092	0.040	0.031-1.321
obrazovanje majke	0.004	0.001	0.990	-0.654-0.662
obrazovanje oca	-0.063	-0.10	0.854	-0.732-0.606

Analiza dobijenih rezultata je pokazala da:

-postoji statistički značajna uticaj uslova života na rezultate postignute na testu Reycumm. Studenti koji imaju bolje uslove života ostvarili su bolje rezultate na testu Reycumm.

-postoji statistički značajan uticaj pola na rezultate postignute na testu Reycumm. Devojke su postigle statistički značajno bolje rezultate u poređenju sa mladićima.

-ne postoji statistički značajan uticaj obrazovanja roditelja sa rezultatima postignutim na Reycumm testu.

Tabela 25. Rezultati multiple linearne regresione analize u kojoj su rezultati testa RavenPM zavisne varijable a pol, uslovi života, obrazovanje roditelja nezavisne varijable

Nezavisne varijable	RavenPM zavisna varijabla			
	b	beta	p	95% CI
constant	48.749		0.000	45.717-51.781
KIBRA	0.296	0.035	0.417	-0.418-1.009
pol	-1.047	-0.092	0.036	-2.026—0.068
uslovi života	0.317	0.049	0.278	-0.257-0.891
obrazovanje majke	0.244	0.044	0.412	-0.341-0.829
obrazovanje oca	0.163	0.029	0.590	-0.431-0.757

Analiza dobijenih rezultata je pokazala da:

-postoji statistički značajan uticaj pola na rezultate ostvarene na RavenPM testu. Mladići su postigli statistički bolje rezultate na ovom testu u poređenju sa devojka.

-ne postoji statistički značajan uticaj uslova života studenata i obrazovanja roditelja sa rezultatima ostvarenim na RavenPM testu.

Tabela 26. Rezultati multiple linearne regresione analize u kojoj su rezultati testa ABimmed zavisne varijable a pol, uslovi života, obrazovanje roditelja nezavisne varijable

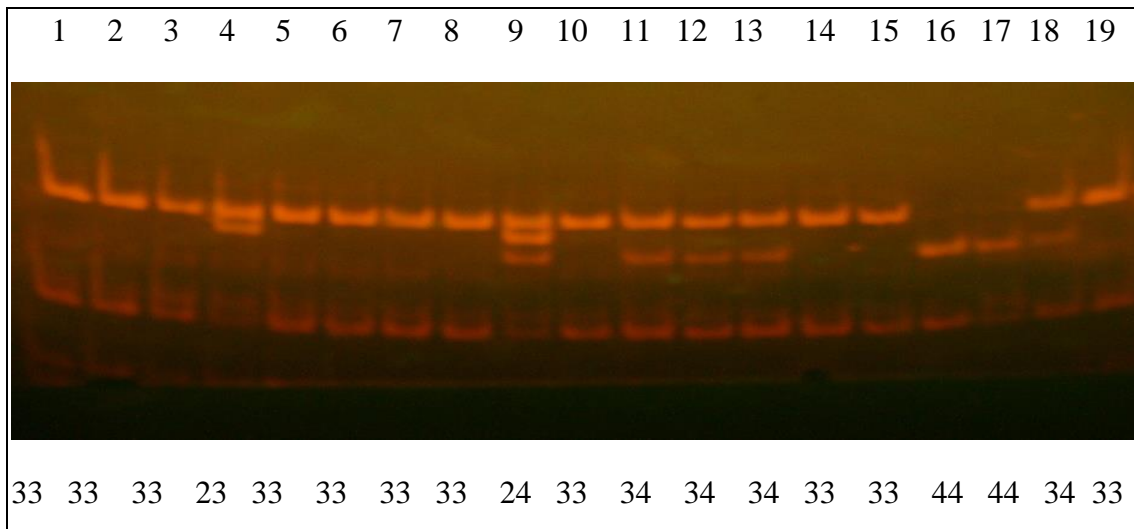
Nezavisne varijable	ABimmed zavisna varijabla			
	b	beta	p	95% CI
constant	36.428		0.000	33.311-39.545
KIBRA	-0.169	-0.020	0.576	-0.900-0.562
pol	0.234	0.020	0.750	-0.772-1.240
uslovi života	0.353	0.053	0.205	-0.236-0.942
obrazovanje majke	-0.258	-0.046	0.371	-0.859-0.343
obrazovanje oca	-0.161	-0.028	0.705	-0.770-0.449

Analiza dobijenih rezultata je pokazala da:

-ne postoji statistički značajan uticaj pola, uslova života studenata i obrazovanja njihovih roditelja sa rezultatima koje ostvaruju na ABimmed testu.

12.3. Rezultati molekularno-genetičkih analiza APOE genotip rs7412/rs429358

Analizom je obuhvaćeno 548 studenata. U ispitivanoj populaciji detektovano je 5 različitih genotipova. Utvrđeno je da su 426 (77.7%) studenta homozgoti za alel E3 (genotip 3/3), njih 55 (10.1%) su heterozigoti genotipa 2/3, 57-oro (10.4%) heterozigoti genotipa 3/4 a svega 4 (0.7%) su homozigoti genotipa 4/4.



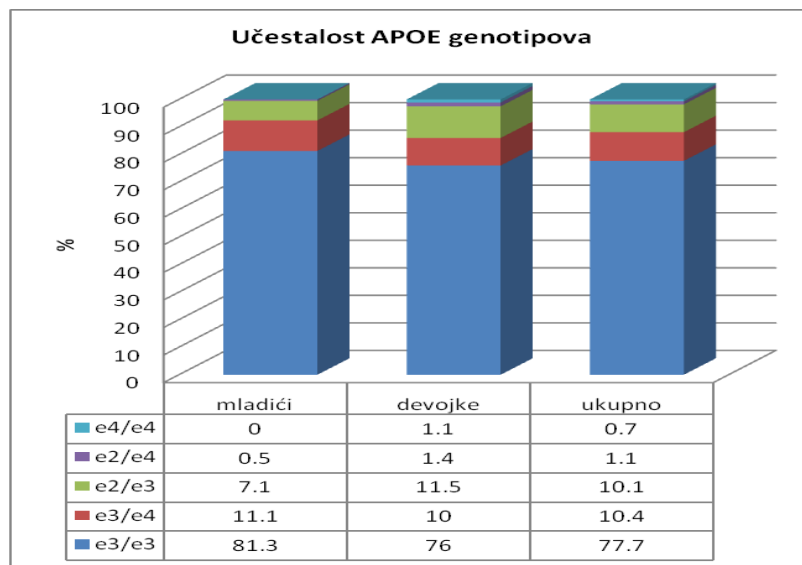
Slika 21. Polimorfizam APOE (112/158) genotipa-izgled traka nakon restrikcione digestije.

Na slici 21. je prikazan poliakrilamidni gel nakon restrikcione analize na kome se može uočiti svih pet detektovanih genotipova. Učestalost genotipova ukupno i po polovima prikazana je u tabeli 27. kao i na grafikonu 8. Razlika učestalosti genotipova po polovima nije statistički značajna ($p=0.520$).

Tabela 27. Učestalost genotipova ApoE ukupno i po polovima

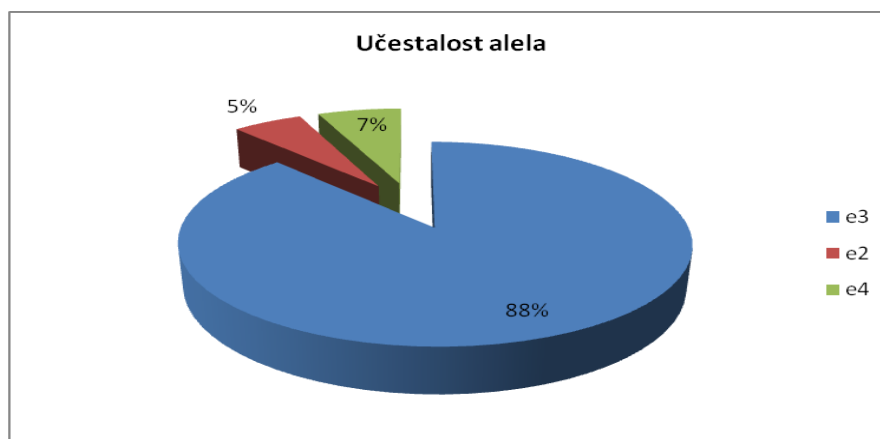
Genotipovi APOE	Ukupno učestalost	%	mladići učestalost	%	Devojke učestalost	%
3/3	426	77.7	148	81.3	278	76.0
3/4	57	10.4	20	11.1	37	10.0
2/3	55	10.1	13	7.1	42	11.5
2/4	6	1.1	1	0.5	5	1.4
4/4	4	0.7	0	0.0	4	1.1
ukupno	548	100.0	182	100.0	366	100.0

Grafikon 8. Učestalost genotipova u celoj populaciji studenata i po polovima izražena u %.



Na osnovu učestalosti genotipova izračunate su učestalosti alela E2, E3 i E4. Učestalost E3 alela je 87.9%, E2 alela 5.6% a E4 alela 6.5%. Dobijene vrednosti prikazane su na grafikonu 9.

Grafikon 9. Učestalost APOE alela u populaciji studenata



U daljem radu smo prema njihovom genotipu studente razvrstali u dve grupe. Prvu grupu čine studenti čiji je genotip E3/E4 ili E4/E4 i označeni su sa E4+. Drugu grupu čine studenti sa genotipom E3/E3 ili E3/E2 i označeni su sa E4-. Studenti sa genotipom E2/E4 (6 ispitanika) isključeni su iz daljeg ispitivanja zbog suprotnog dejstva alela E2 i E4.

Tabela 28. Demografske, socioekonomske i memorijske karakteristike u populaciji studenata u zavisnosti od njihovog APOE genotipa.

	E4+	E4-	Ukupno	p
N	61	481	542	
Starost (godine)	20.16 ± 0.78	20.27 ± 0.83	20.26 ± 0.82	0.309
Žene / Muškarci	41/20	320/161	361/181	0.520
Obrazovanje majke (%)				
osnovna škola	1 (1.6)	17 (3.5)	18 (3.3)	
srednja škola	25 (41.0)	205 (42.7)	230 (42.5)	
viša škola	12 (19.7)	70 (14.6)	82 (15.2)	
fakultet	23 (37.7)	188 (39.2)	211(39.0)	
Obrazovanje oca (%)				
osnovna škola	0 (0.0)	11 (2.3)	11 (2.0)	
srednja škola	24(39.3)	170 (35.6)	194 (36.1)	
viša škola	10 (16.4)	72 (15.1)	82 (15.2)	
fakultet	27 (44.3)	224 (47.0)	251 (46.7)	
Uslovi života				
loši	2 (3.3)	20 (4.2)	22 (4.1)	
dobri	18 (30.0)	120 (25.2)	138 (25.7)	
vrlo dobri	25(41.7)	205 (43.0)	230 (42.8)	
odlični	15 (25.0)	132 (27.7)	147 (27.4)	
Prosečna ocena u srednjoj školi	4.80±0.41	4.81±0.41	4.80±0.41	0.744
Prosečna ocena na fakultetu	8.29±1.11	8.53±1.05	8.51±1.06	0.145
Sposobnost učenja				
brza	32 (52.5)	295 (61.8)	327 (60.8)	1.999
spora	29 (47.5)	182 (38.2)	211 (39.2)	0.102
Broj ponavljanja	3.0±1.09	2.87±1.03	2.89±1.04	0.430
Opšte kognitivne sposobnosti				
RavenPM	48.75±5.90	49.86±5.26	49.67±5.37	0.368
Pažnja/radna memorija				
TRCmax	9.99 ± 1.84	9.94 ±1.92	10.02± 1.70	0.150
Epizodička memorija				
Rey cumm	60.03±6.72	61.57±6.09	61.27±6.17	0.092
WMS-R ABimm	35.76±5.51	36.39±5.53	36.25±5.53	0.630

U Tabeli 28. prikazani su demografske, socioekonomske i memorijske karakteristike studenata u zavisnosti od prisustva E4 alela.

Analiza dobijenih rezultata pokazala je da:

- nije uočena statistički značajna razlika ni u jednoj analiziranoj karakteristici

Nakon ove analize rezultate opštih kognitivnih i memorijskih sposobnosti grupisali smo po polovima i u zavisnosti od prisustva E4 alela (tabela 29.).

Tabela 29. Rezultati testova opštih kognitivnih i memorijskih sposobnosti u zavisnosti od prisustva E4 alela grupisani po polovima

	genotip	broj	mladići	p	broj	devojke	p
TRCmax	E4+	20	7.25±0.80	0.289	40	7.27±0.75	0.418
	E4-	160	7.44±0.75		319	7.32±0.79	
Raven PM	E4+	20	49.70±6.80	0.803	41	49.19±5.90	0.354
	E4-	161	51.53±5.15		320	49.41±5.26	
Reycumm	E4+	20	58.35±7.21	0.303	41	60.80±6.41	0.157
	E4-	160	59.90±6.79		317	62.21±5.55	
ABimm	E4+	20	35.00±5.75	0.453	41	36.32±5.41	0.934
	E4-	160	36.05±5.78		319	36.42±5.41	

Statistička analiza primenom Mann-Withney testa pokazala je da:

- Ne postoji statistički značajna razlika u rezultatima testova u zavisnosti od prisustva E4 alela ni u grupi mladića ni u grupi devojaka. Ipak, iako nije dostignuta statistički značajna razlika može se uočiti da i u grupi mladića i u grupi devojaka nosioci E4 alela postižu lošije rezultate na svim primenjenim testovima.

Multipla linearna regresiona analiza

Multipla linearna regresiona analiza primenjena je u cilju ispitivanja uticaja APOE genotipa kao nezavisne varijable na rezultate koje studenti postižu na testovima memorijskih sposobnosti koji predstavljaju zavisne varijable. Analiza je izvršena bez prilagođavanja (tabela 30.) i nakon prilagođavanja na demografske i socioekonomske karakteristike: pol, obrazovanje roditelja i uslove života studenata (tabela 31.).

Tabela 30. Rezultati linearne regresione analize uticaja APOE genotipa kao nezavisne varijable na rezultate postignute na testovima kao zavisne varijable

Zavisne varijable	APOE E4+ vs E4-				
	constant	B	beta	p	95% CI
TRCMax	7.27	0.10	0.04	0.368	-0.11 – 0.30
REYcumm	60.00	1.43	0.07	0.090	-0.21 – 3.08
RAVENPM	48.69	1.10	0.06	0.131	-0.33 – 2.53
ABimm	35.88	0.41	0.02	0.588	-1.07 - 1.88

Linearna regresiona analiza rezultata testova opštih kognitivnih i memorijskih sposobnosti pokazali su da APOE genotip studenata ne utiče na rezultate postignute na testovima opštih kognitivnih i memorijskih sposobnosti.

Tabela 31. Rezultati multiple regresione analize u kojoj su testovi zavisne varijable a APOE genotip nezavisna varijabla uz prilagođavanje na pol, uslove života i obrazovanje roditelja

Zavisne varijable	APOE E4+ vs E4- prilagođeno na pol, uslove života i obrazovanje roditelja				
	constant	b	beta	p	95% CI
TRCMax	6.99	0.10	0.04	0.336	-0.12 – 0.31
REYcumm	54.42	1.51	0.08	0.069	-0.12 – 3.13
RAVENPM	48.32	1.15	0.07	0.118	-0.29 – 2.58
ABimm	35.21	0.49	0.03	0.520	-1.00 – 1.98

Multipla linearna regresiona analiza je pokazala da uticaj APOE genotipa na rezultate testova nije statistički značajan ni nakon prilagođavanja na pol, uslove života i obrazovanje roditelja. Ipak, može se uočiti trend po kome bolje rezultate na REYcumm testu postižu studenti koji nisu nosioci APOE4 alela ($p=0.069$).

Iz prikazanih tabela (32, 33, 34, 35) vidi se i uticaj ostalih varijabli: pola, obrazovanja roditelja i uslova života na rezultate postignute na testovima.

Tabela 32. Rezultati analize uticaja APOE genotipa, pola, uslova života i obrazovanja roditelja kao nezavisnih varijabli na rezultate testa TRCmax kao zavisne varijable

Nezavisne varijable	b	beta	p	95% CI
constant	6.992		0.000	6.559-7.426
APOE E4+/E4-	0.103	0.042	0.336	-0.107-0.312
pol	-0.096	-0.058	0.182	-0.237-0.045
uslovi života	0.086	0.092	0.042	-0.003-0.170
obrazovanje majke	0.015	-0.019	0.727	-0.069-0.990
obrazovanje oca	0.044	0.053	0.321	-0.043-0.930

Analiza je pokazala da uslovi života studenata statistički značajno utiču na rezultate testa TRCmax. Studenti koji imaju bolje uslove života postigli su bolje rezultate na primenjenom testu.

Tabela 33. Rezultati analize uticaja APOE genotipa, pola, uslova života i obrazovanja roditelja kao nezavisnih varijabli na rezultate testa REYcumm kao zavisne varijable

Nezavisne varijable	b	beta	p	95% CI
constant	54.423		0.000	51.031-57.814
APOE E4+/E4-	1.508	0.078	0.069	-0.119-3.135
pol	2.255	-0.173	0.000	1.152-3.358
uslovi života	0.567	0.076	0.087	-0.082-1.217
obrazovanje majke	-0.028	-0.004	0.934	-0.689-0.633
obrazovanje oca	0.054	0.008	0.876	-0.623-0.731

Analiza je potvrdila statistički značajan uticaj pola na rezultate studenata postignute na REY cumm testu. Studentkinje postižu statistički značajno bolje rezultate na ovom testu u poređenju sa kolegama muškog pola.

Tabela 34. Rezultati analize uticaja APOE genotipa, pola, uslova života i obrazovanja roditelja kao nezavisnih varijabli na rezultate testa RavenPM kao zavisne varijable

Nezavisne varijable	b	beta	p	95% CI
constant	48.317		0.000	45.327-51.306
APOE E4+/E4-	1.146	0.067	0.118	-0.292-2.584
pol	-1.110	-0.097	0.025	-2.082-(-0.137)
uslovi života	0.305	0.047	0.297	-0.268-0.878
obrazovanje majke	0.263	0.047	0.375	-0.319-0.846
obrazovanje oca	0.161	0.028	0.596	-0.435-0.757

Analiza je potvrdila da pol statistički značajno utiče na rezultate postignute na RavenPM testu. Studenti muškog pola postižu bolje rezultate u poređenju sa studentkinjama.

Tabela 35. Rezultati analize uticaja APOE genotipa, pola, uslova života i obrazovanja roditelja kao nezavisnih varijabli na rezultate testa ABimmed kao zavisne varijable

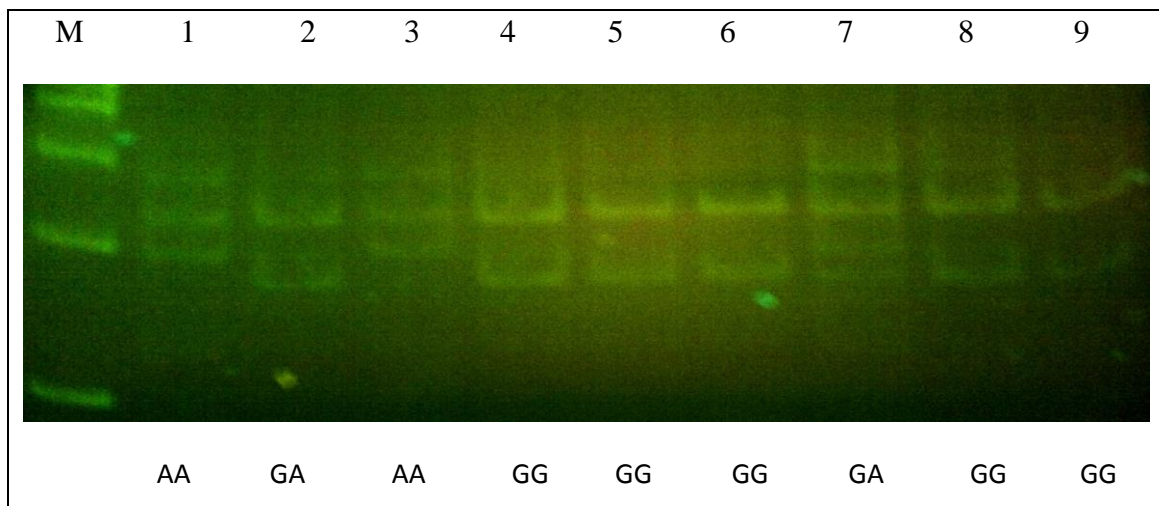
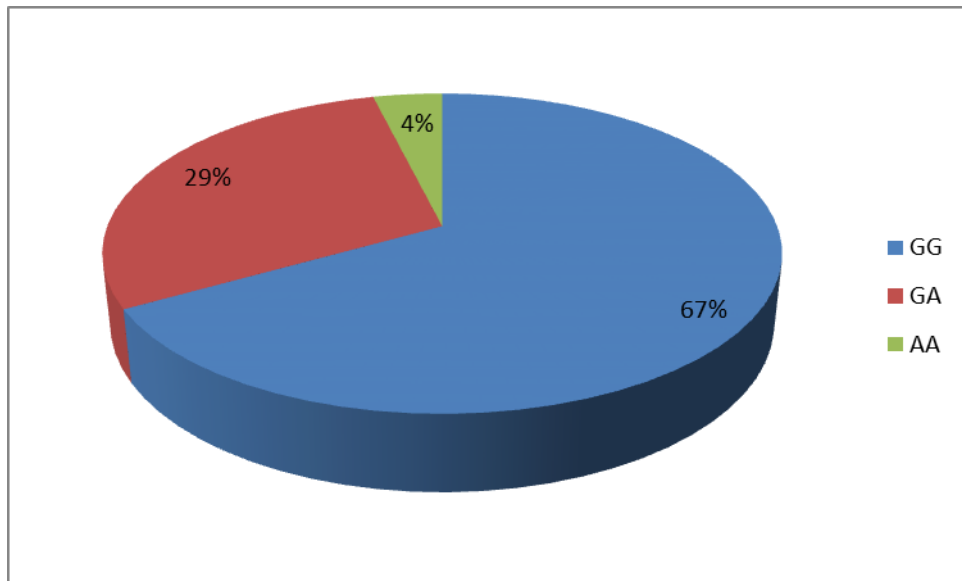
Nezavisne varijable	b	beta	p	95% CI
constant	35.215		0.000	32.115-38.315
APOE E4+/E4-	0.488	0.028	0.520	-1.000-1.976
pol	0.358	0.031	0.486	-0.651-1.368
uslovi života	0.396	0.059	0.191	-0.198-0.990
obrazovanje majke	-0.207	-0.036	0.502	-0.812-0.398
obrazovanje oca	-0.177	-0.031	0.574	-0.795-0.441

Analiza je pokazala da ni jedna od analiziranih varijabli ne utiče na rezultate postignute na ABimmed testu.

12.4. Rezultati genetičkih analiza-BCHE genotip

Analizom je obuhvaćeno 543 studenta. Utvrđeno je da je 363 studenata tj. 66.8% homozigot za češći alel G (genotip GG), 159-oro tj. 29.3% su heterozigoti (genotip GA) a svega njih 21 (3.9%) je homozigot za ređi alel A (genotip AA). Dobijene vrednosti prikazane su i na grafikonu 10.

Grafikon 10. Učestalost BCHE genotipova u populaciji studenata

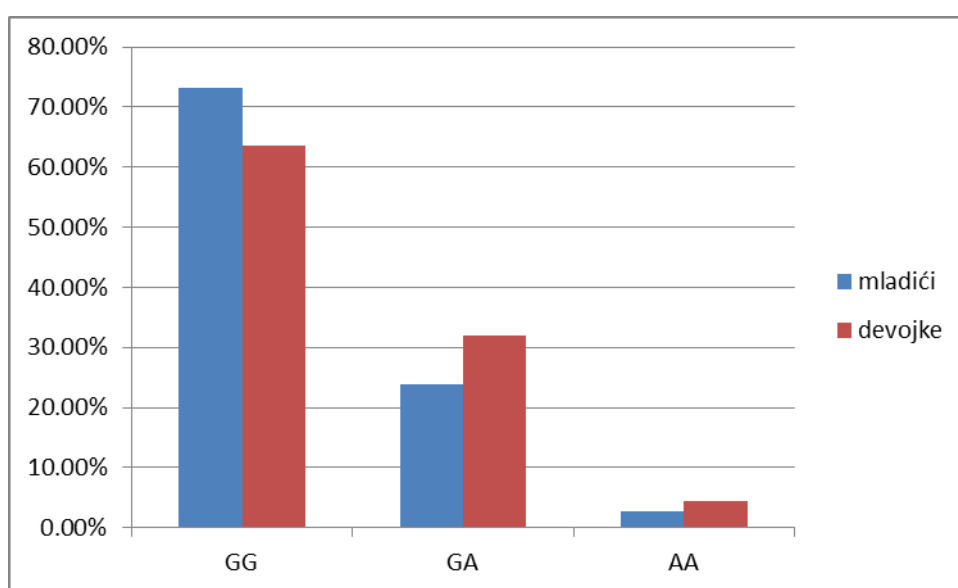


Slika 22. Polimorfizam BCHE (rs1803274) - izgled traka na gelu nakon restrikcione digestije.

Na slici 22 je prikazana fotografija gela nakon digestije PCR produkata restrikcionim enzimom. Na osnovu učestalosti genotipova izračunate su učestalosti alela G i A. Učestalost alela G je 81.5%, a alela A 18.5%.

Kod mladića učestalost GG genotipa je 73.3%, GA genotipa 23.9% a AA genotipa 2.8%. Učestalost GG genotipa kod devojaka je 63.6%, GA genotipa 31.9% a AA genotipa 4.5%. Razlika učestalosti genotipova između devojaka i mladića je statistički značajna ($p=0.013$).

Grafikon 11. Učestalost BCHE genotipova u zavisnosti od pola



U tabeli 36. prikazani su demografske, socioekonomske i memorijske karakteristike studenata u zavisnosti od BDNF genotipa.

Tabela 36. Demografske, socioekonomske i kognitivne karakteristike u populaciji studenata u zavisnosti od njihovog BCHE genotipa

	G/G	G/A	A/A	Ukupno	p
N	363	159	21	543	
Starost (godine±SD)	20.26±0.86	20.20±0.68	20.76±0.94	20.26±0.82	
Žene / Muškarci	231/132	116/43	16/5	363/180	0.013
Obrazovanje majke (%)					
osnovna škola	13 (3.6)	3 (1.9)	2 (9.5)	18 (3.3)	
srednja škola	162 (44.6)	64 (40.5)	7 (33.3)	233 (43.0)	
viša škola	48 (13.2)	28 (17.7)	5 (23.8)	81 (14.9)	
fakultet	140 (38.6)	63 (39.9)	7 (33.3)	210 (38.7)	
Obrazovanje oca (%)					
osnovna škola	10 (2.8)	1 (0.6)	0 (0.0)	11 (2.0)	
srednja škola	135 (37.5)	48 (30.4)	13 (61.9)	196 (36.4)	
viša škola	57 (15.8)	23 (14.6)	2 (9.5)	82 (15.2)	
fakultet	158 (43.9)	86 (54.4)	6 (28.6)	250 (46.40)	
Uslovi života (%)					
loši	12 (3.3)	8 (5.0)	2 (9.5)	22 (4.1)	
dobri	96 (26.7)	38 (23.9)	5 (23.8)	139 (25.8)	
vrlo dobri	151 (42.1)	65 (40.9)	13 (61.9)	229 (42.5)	
odlični	100 (27.9)	48 (30.2)	1 (4.8)	149 (27.6)	
Prosečna ocena u srednjoj školi±SD	4.79±0.42	4.83±0.41	4.81±0.40	4.80±0.41	0.673
Prosečna ocena na fakultetu	8.57±1.08	8.42±1.04	8.20±0.73	8.51±1.06	0.130
Sposobnost učenja (%)					
Brza	221 (61.2)	96 (60.8)	12 (60.9)	329 (61.0)	0.990
Spora	140 (38.8)	62 (39.2)	8 (39.1)	210 (39.0)	
Ponavljjanje gradiva					0.806
Opšte kognitivne sposobnosti					
RavenPM	49.68±5.38	49.68±5.07	48.71±6.99	49.64±5.36	0.920
Pažnja/radna memorija					
TRCmax	7.30±0.82	7.45±0.68	7.45±0.83	7.35±0.78	0.117
Epizodička memorija					
Reycumm	61.12±6.20	61.71±5.89	61.86±6.43	61.32±6.12	0.600
WMS-R ABimm					0.953

Analiza rezultata prikazanih u tabeli 38. je pokazala da nema statistički značajne razlike u zavisnosti od BCHE genotipa ni u jednoj od analiziranih karakteristika.

U tabeli 37. Prikazani su rezultati dobijeni putem u pitnika kao i rezultati testova memorijskih sposobnosti grupisani u zavisnosti od prisustva A alela.

Tabela 37. Demografske i kognitivne karakteristike u populaciji studenata u zavisnosti od prisustva K varijante (A alela)

	GG	GA +AA	p
N	363	180	
Starost (godine±SD)	20.26±0.86	20.20±0.68	
Žene / Muškarci	231/132	132/48	0.024
Prosečna ocena u srednjoj školi±SD	4.79±0.42	4.83±0.41	0.386
Prosečna ocena na fakultetu	8.57±1.08	8.39±1.01	0.130
Sposobnost učenja (%)			
Brza	221 (61.2)	108 (60.7)	0.903
Spora	140 (38.8)	70 (39.3)	
Ponavljjanje gradiva	2.89±1.00	2.87±1.14	0.675
Opšte kognitivne sposobnosti			
Raven- SPM	49.68±5.38	49.57±5.32	0.704
Pažnja/radna memorija			
TRCmax	7.30±0.82	7.45±0.96	0.041
Epizodička memorija			
Reycumm	61.12±6.20	61.73±5.94	0.313
WMS-R ABimm	36.20±5.69	36.42±5.00	0.762

Analiza rezultata je pokazala da:

- je učestalost K varijante (A alela) statistički značajno veća u populaciji devojaka u poređenju sa populacijom mladića

- postoji statistički značajna razlika u rezultatima postignutim na TRCmax testu u zavisnosti od prisustva A alela ($p=0.041$). Nosioци K varijante (A alela) postižu statistički značajno bolje rezultate na TRCmax testu u odnosu na studente GG genotipa.

-ne postoji statistički značajna razlika u rezultatima postignutim na drugim testovima memorijski sposobnosti i testu opštih kognitivnih sposobnosti.

Zatim smo analizirali rezultate dobijene na testu opštih kognitivnih i memorijskih sposobnosti u zavisnosti od BCHE genotipova odvojeno po polovima (tabela 38.).

Tabela 38. Srednje vrednosti rezultati testova opštih kognitivnih i memorijskih sposobnosti \pm SD u zavisnosti od BCHE genotipa grupisani po polovima

	genotip	broj	mladići	p	broj	devojke	p
TRCmax	GG	131	7.39 \pm 0.79	F=0.848	230	7.25 \pm 0.83	F=4.632
	GA	43	7.46 \pm 0.71	p=0.655	115	7.44 \pm 0.67	p=0.099
	AA	5	7.70 \pm 0.27		16	7.37 \pm 0.94	
RavenPM	GG	132	50.61 \pm 5.40	F=1.923	231	49.14 \pm 5.31	F=0.548
	GA	43	49.93 \pm 4.65	p=0.382	116	49.59 \pm 6.85	p=0.760
	AA	5	48.00 \pm 8.21		16	48.94 \pm 6.85	
REYcumm	GG	131	59.42 \pm 6.65	F=1.542	229	62.09 \pm 5.72	F=0.031
	GA	42	60.71 \pm 6.69	p=0.462	115	62.08 \pm 5.56	p=0.985
	AA	5	60.60 \pm 8.44		16	62.09 \pm 5.66	
Abimm	GG	131	35.96 \pm 5.81	F=0.161	230	36.43 \pm 4.95	F=0.071
	GA	42	36.28 \pm 4.94	p=0.923	116	36.94 \pm 5.71	p=0.965
	AA	5	35.60 \pm 5.81		16	36.94 \pm 5.70	

Analiza rezultata primenom Kruskal-Wallis testa pokazala je da nema statistički značajne razlike u rezultatima postignutim na testovima memorijskih i opštih kognitivnih sposobnosti u zavisnosti od BCHE genotipa ni u grupi mladića ni u grupi devojaka.

Takođe, izvršena je i analiza rezultata po polovima u zavisnosti od prisustva A alela. Dobijene vrednosti prikazane su u tabeli 39.

Tabela 39. Rezultati testova opštih kognitivnih i memorijskih sposobnosti u zavisnosti od prisustva K varijante (A alela) grupisani po polovima

	genotip	broj	mladići	p	broj	devojke	p
TRCmax	GG	131	7.39±0.79	0.899	230	7.25±0.83	0.034
	GA+AA	48	7.49±0.68		131	7.43±0.70	
RavenPM	GG	132	50.61±5.40	0.171	231	49.14±5.31	0.459
	GA+AA	48	49.73±5.04		132	49.51±5.43	
REYcumm	GG	131	59.42±6.65	0.218	229	62.09±5.72	0.929
	GA+AA	47	60.70±6.79		131	62.09±5.58	
Abimm	GG	131	35.96±5.81	0.805	230	36.43±4.95	0.893
	GA+AA	47	36.21±4.98		132	36.49±5.03	

Analiza dobijenih rezultata pokazala je da:

-postoji statistički značajna razlika u rezultatima postignutim na testu TRCmax u grupi devojaka. Devojke nosioci A alela postigle su bolje rezultate na testu u odnosu na devojke nosioce GG genotipa. U grupi mladića uočen je isti trend ali statistička značajnost nije dostignuta.

-ne postoji statistički značajna razlika u rezultatima postignutim na drugim testovima memorijskih sposobnosti kao ni na testu opštih kognitivnih sposobnosti ni u grupi mladića ni u grupi devojaka.

Multipla linearna regresiona analiza

Multipla linearna regresiona analiza primenjena je u cilju ispitivanja uticaja BCHE genotipa ili alela kao nezavisne varijable na rezultate koje studenti postižu na testovima memorijskih sposobnosti kao zavisnih varijabli. Analiza je izvršena bez prilagođavanja (tabela 40.) i nakon prilagođavanja na pol, obrazovanje roditelja i uslove života studenata (tabela 41.).

Tabela 40. Rezultati multiple linearne regresione analize povezanosti rezultata postignutih na testovima kao zavisnih varijabli i BCHE genotipa kao nezavisne varijable

Zavisne varijable	BCHE genotip				
	constant	b	beta	p	95% CI
TRCMax	7.19	0.12	0.08	0.05	-0.00 – 0.24
REYcumm	60.63	0.50	-0.05	0.289	-0.43 – 1.43
RavenPM	49.91	-0.20	-0.02	0.637	-1.01 – 0.62
ABimm	36.01	0.20	0.02	0.642	-0.63 - 1.03

Analiza rezultata je pokazala da:

- postoji statistički značajan uticaj (granična značajnost) BCHE genotipa na rezultate postignute na TRCmax testu (p=0.05).
- ne postoji statistički značajan uticaj BCHE genotipa na rezultate postignute na ostalim primenjenim testovima

Tabela 41. Rezultati multiple linearne regresione analize povezanosti rezultata postignutih na testovima kao zavisnih varijabli i BCHE genotipa kao nezavisne varijable prilagođeno na pol, obrazovanje roditelja i uslove života

Zavisne varijable	BCHE genotip, prilagođeno na pol, uslove života i obrazovanje roditelja				
	constant	b	beta	p	95% CI
TRCMax	6.90	0.14	0.10	0.019	0.02 – 0.26
REYcumm	55.38	0.38	0.03	0.419	-0.54 – 1.30
RavenPM	49.38	-0.07	-0.01	0.865	-0.89 – 0.75
ABimm	35.75	0.24	0.02	0.576	-0.60 – 1.08

Analiza rezultata dobijenih nakon prilagođavanja na pol, uslove života i obrazovanje roditelja (tabela 41.) pokazala je da:

- postoji statistički značajna povezanost BCHE genotipa i rezultata postignutih na TRC max testu.

-ne postoji statistički značajna povezanost između BCHE genotipa i rezultata postignutih na ostalim testovima.

Tabela 42. Rezultati analize uticaja BCHE genotipa, pola, uslova života i obrazovanja roditelja kao nezavisnih varijabli na rezultate testa TRCmax kao zavisne varijable

Nezavisne varijable	b	beta	p	95% CI
Constant	6.895		0.000	6.477-7.313
BCHE	0.142	0.101	0.019	0.023-0.260
Pol	-0.113	-0.068	0.118	-0.255-0.029
uslovi života	0.100	0.106	0.018	-0.018-0.183
obrazovanje majke	0.012	0.015	0.781	-0.073-0.097
obrazovanje oca	0.040	0.048	0.368	-0.047-0.126

Analiza rezultata prikazanih u tabeli 42. je pokazala da:

-BCHE genotip statistički značajno utiče na rezultate koje studenti postižu na testu TRCmax (p=0.019).

-postoji statistički značajan uticaj uslova života studenata na rezultate testa TRCmax. Studenti koji imaju bolje uslove života postigli su bolje rezultate na primenjenom testu (p=0.018).

- ne postoji statistički značajan uticaj ostalih analiziranih varijabli na postignute rezultate.

Tabela 43. Rezultati analize uticaja BCHE genotipa, pola, uslova života i obrazovanja roditelja kao nezavisnih varijabli na rezultate testa REYcum kao zavisne varijable

Nezavisne varijable	b	beta	p	95% CI
Constant	55.383		0.000	52.133-58.632
BCHE	0.379	0.035	0.419	-0.541-1.299
Pol	2.189	0.170	0.000	1.088-3.290
uslovi života	0.685	0.093	0.036	0.044-1.325
obrazovanje majke	0.031	-0.005	0.926	-0.626-0.689
obrazovanje oca	-0.108	-0.017	0.752	-0.781-0.564

Analiza rezultata prikazanih u tabeli 43. je potvrdila statistički značajan uticaj pola na rezultate studenata postignute na REY cumm testu ($p=0.000$). Studentkinje postižu statistički značajno bolje rezultate na ovom testu u poređenju sa studentima.

Takođe, pokazano je da i uslovi života studenata statistički značajno utiču na rezultate postignute na REYcumm testu ($p=0.036$).

Tabela 44. Rezultati analize uticaja BCHE genotipa, pola, uslova života i obrazovanja roditelja kao nezavisnih varijabli na rezultate testa RavenPM kao zavisne varijable

Nezavisne varijable	b	beta	p	95% CI
Constant	49.385		0.000	46.499-52.271
BCHE	-0.071	-0.007	0.865	-0.890-0.747
Pol	-1.091	-0.096	0.029	-2.070-(-0.112)
uslovi života	0.318	0.049	0.274	-0.252-0.889
obrazovanje majke	0.229	0.041	0.441	-0.355-0.814
obrazovanje oca	0.183	0.032	0.547	-0.414-0.781

Analiza rezultata (tabela 44.) je potvrdila uticaj pola na rezultate postignute na RavenPM testu. Studenti postižu bolje rezultate u poređenju sa studentkinjama.

Tabela 45. Rezultati analize uticaja BCHE genotipa, pola, uslova života i obrazovanja roditelja kao nezavisnih varijabli na rezultate testa ABimmed kao zavisne varijable

Nezavisne varijable	b	beta	p	95% CI
Constant	35.754		0.000	32.781-38.711
BCHE	0.239	0.025	0.576	-0.600-1.078
Pol	0.164	0.014	0.750	-0.843-1.170
uslovi života	0.378	0.057	0.205	-0.208-0.963
obrazovanje majke	-0.274	-0.049	0.371	-0.875-0.327
obrazovanje oca	-0.118	-0.021	0.705	-0.731-0.495

Analiza rezultata prikazanih u tabeli 45. je pokazala da ni jedna od analiziranih varijabli ne utiče na rezultate postignute na ABimmed testu.

Takođe, izvršena je i analiza po alelskom modelu koja ispituje uticaj K varijante (A alela) na rezultate primenjenih testova.

Tabela 46. Rezultati multiple linearne regresione analize uticaja A alela kao nezavisne varijable na rezultate postignute na testovima koji predstavljaju zavisne varijable

Zavisne varijable	BCHE GG/GA+AA				
	constant	b	beta	p	95% CI
TRCMax	7.15	0.15	0.09	0.038	-0.00 – 0.29
REYcumm	60.51	0.61	0.05	0.276	-0.49 – 1.71
RavenPM	49.79	-0.11	-0.01	0.820	-1.07 – 0.85
ABimm	35.99	0.21	0.02	0.667	-0.77 - 1.20

Tabela 47. Rezultati multiple linearne regresione analize uticaja A alela kao nezavisne varijable, prilagođene na pol, uslove života i obrazovanje roditelja, na rezultate postignute na testovima koji predstavljaju zavisne varijable

Zavisne varijable	BCHE GG/GA+AA prilagođeno na pol, uslove života i obrazovanje roditelja				
	constant	b	beta	p	95% CI
TRCMax	6.87	0.17	0.10	0.017	0.03 – 0.31
REYcumm	55.34	0.44	0.03	0.425	-0.65 – 1.54
RavenPM	49.29	-0.01	-0.01	0.983	-0.96 – 0.98
ABimm	35.73	0.24	0.02	0.588	-0.72 – 1.27

Analiza dobijenih rezultata bez prilagođavanja i nakon prilagođavanja na pol, uslove života i obrazovanje roditelja (tabele 46, 47) je pokazala da:

-postoji statistički značajna povezanost BCHE genotipova kao i prisustva A alela (K varijante) i rezultata postignutih na testu pažnje/radne memorije. Povezanost je statistički značajna i nakon prilagođavanja na pol, uslove života i obrazovanje roditelja. Studenti nosioci K varijante postigli su bolje rezultate na testu TRCmax.

-ne postoji statistički značajna povezanost BCHE K alela sa rezultatima postignutim na testovima opštih kognitivnih sposobnosti i epizodičke memorije

Multiplom linearnom regresionom analizom analizirali smo da li i kako rezultati koje su studenti postigli na testovima TRCmax, REYcumm, RavenPM i ABimmed predviđaju njihov uspeh tokom školovanja.

Tabela 48. Rezultati multiple linearne regresione analize u kojoj je uspeh u učenju zavisna varijabla a rezultati testova kognitivnih sposobnosti nezavisne varijable

Nezavisne varijable	Zavisne varijable								
	Prosečna ocena u srednjoj školi			Prosečna ocena na fakultetu			Koliko puta se ponavlja gradivo		
	B	Beta	P	B	Beta	p	B	Beta	p
Konstanta	4.754		0.000	4.907		0.007	0.075		0.968
TRCmax	0.003	0.006	0.887	0.012	0.011	0.809	0.092	0.082	0.072
REYcumm	0.007	0.102	0.040	0.008	0.046	0.355	-0.008	-0.047	0.355
RAVENPM	-0.003	-0.045	0.338	0.027	0.143	0.003	0.000	-0.001	0.978
A+Bimmed	0.000	0.000	0.998	0.014	0.072	0.115	0.004	0.021	0.647

Analiza rezultata prikazanih u tabeli 48. je pokazala da:

- Prosečna ocena u srednjoj školi je statistički značajno povezana sa rezultatima postignutim na REYcumm testu. Studenti koji su postizali bolje rezultate na REYcumm testu imali su i veću prosečnu ocenu u srednjoj školi.
- Prosečna ocena na fakultetu statistički značajno je povezana sa rezultatima postignutim na testu RavenPM. Studenti koji su postizali bolje rezultate na testu opštih kognitivnih sposobnosti RavenPM imaju veću prosečnu ocenu na fakultetu.
- Uočava se trend da više puta materijale za ispit prelaze studenti koji su postigli bolje rezultate na TRCmax testu ali statistička značajnost nije dostignuta.

Takođe smo primenom logističke regresione analize analizirali da li rezultati testova kognitivnih sposobnosti kao nezavisne varijable predviđaju brzinu učenja studenata.

Tabela 49. Rezultati logističke regresione analize u kojoj je brzina učenja zavisna varijabla a rezultati testova kognitivnih sposobnosti nezavisne varijable

Nezavisne varijable	Brzina učenja			
	B	P	OR	95% CI
Konstanta	3.126	0.415	22.78	
TRCmax	-0.001	0.993	0.99	0.85 – 1.22
REYcummm	0.014	0.447	1.01	0.98 – 1.05
RavenPM	-0.056	0.004	0.94	0.91 - 0.98
ABimmed	-0.009	0.636	0.99	0.95 – 1.03

Analiza rezultata (tabela 49) je pokazala da:

- Postoji statistički značajana povezanost brzine učenja sa rezultatima postignutim na testu RAVENPM. Brže, po sopstvenom iskazu, uče oni sa postignutim boljim rezultatima na testu RAVENPM.

Ispitivan je i uticaj svih analiziranih polimorfizama na rezultate postignute u srednjoj školi i na fakultetu kao i na broj ponavljanja gradiva pre izlaska na ispit. Ispitivanje je vršeno po genotipskom i alelskom modelu. Rezultati su prikazani u tabeli 50.

Tabela 50. Rezultati multiple linearne regresione analize uticaja analiziranih genotipova na postignut uspeh tokom školovanja

Nezavisne varijable	Zavisne varijable								
	Prosečna ocena u srednjoj školi			Prosečna ocena na fakultetu			Broj ponavljanja		
	B	Beta	p	B	Beta	p	B	Beta	p
Konstanta	4.754		0.000	4.907		0.007	0.075		0.968
APOE E4+/E4-	0.009	0.007	0.870	-0.245	0.073	0.091	-0.131	-0.040	0.361
BDNF GG/GA	-0.024	-0.053	0.220	0.043	0.036	0.404	0.062	0.053	0.234
BCHE	0.011	0.015	0.729	-0.161	0.085	0.051	-0.001	-0.001	0.987
BCHE GG/GA+AA	0.014	0.016	0.719	-0.181	-0.081	0.064	-0.014	-0.007	0.884
KIBRA	-0.003	-0.005	0.903	-0.017	-0.010	0.815	-0.036	-0.023	0.599
KIBRA CC/CT+TT	-0.022	-0.026	0.540	-0.010	-0.005	0.916	-0.075	-0.037	0.401

Analiza je pokazala da analizirani genotipovi ne utiču statistički značajano na prosek ocena u srednjoj školi i na fakultetu kao i ličnu procenu studenata o brzini učenja.

Primenom logističke regresione analize ispitan je uticaj analiziranih genotipova i alela na brzinu savladavanja gradiva studenata. Dobijeni rezultati prikazani su u tabeli 51.

Tabela 51. Rezultati logističke regresione analize uticaja analiziranih genotipova na brzinu učenja prilagođeno na pol, uslove života i obrazovanje roditelja

Nezavisne varijable	Brzina učenja zavisna varijabla			
	B	p	OR	95% CI
Konstanta	3.126	0.415	22.78	
APOE	-0.325	0.242	1.37	0.42-1.25
BNDF GG/GA	0.014	0.901	1.01	0.89-1.25
BCHE	0.022	0.891	1.02	0.75-1.40
BCHE GG/GA+AA	0.023	0.903	1.02	0.71-1.48
KIBRA	0.114	0.410	1.12	0.85-1.47
KIBRA CC/CT+TT	0.186	0.296	1.20	0.85-1.71

Analiza je pokazala da ne postoji statistički značajan uticaj analiziranih genotipova i alela na procenu studenata o brzini učenja.

DISKUSIJA

Memorija predstavlja sposobnost privremenog ili trajnog skladištenja i prizivanja informacija stečenih iskustvom ili aktivnim učenjem. Memorijske sposobnosti ljudi imaju poligensku, tj. multifaktorsku osnovu koja uključuje genetičke faktore predispozicije i činioce iz spoljne sredine. Heritabilnost kompleksnih osobina kao što je memorija zavisi od varijacija u velikom broju gena sa relativno malim pojedinačnim efektom. Osnovno pitanje koje se postavlja je kako i koje varijacije u našim genima utiču na individualne razlike u memorijskim sposobnostima. U ispitivanju udela nasledne komponente kod poligenih svojstava aktuelne su analize genskih polimorfizama. Da bi se utvrdilo da li neki polimorfizam predstavlja predispoziciju za ispoljavanje datog svojstva primenjuju se studije asocijacije u kojima se analizira udruženost ispitivanog svojstva sa određenim genskim varijantama. Genetička ispitivanja tog tipa omogućavaju nam otkrivanje gena odgovornih za individualne varijacije u našim memorijskim sposobnostima.

Dosadašnja istraživanja (142, 189) odnosila su se pretežno na ispitivanja uticaja genskih polimorfizama kod starijih osoba sa ili bez kognitivnih poremećaja. U svetu kao i kod nas, mali broj istraživanja usmeren je na ispitivanje asocijacije polimorfizama sa memorijskim sposobnostima zdravih osoba mlađe životne dobi. Praktični cilj proučavanja gena koji utiču na naše memorijske sposobnosti jeste otkrivanje novih strategija za terapiju različitih kognitivnih poremećaja kako tokom normalnog procesa starenja tako i kod bolesti kao što su Alchajmerova bolest i drugi tipovi demencija. Rano otkrivanje genotipa sa predispozicijom za neki od kognitivih poremećaja omogućava blagovremenu primenu preventivnih mera kojima se utiče na promenljive faktore rizika. Ovakav pristup je od velikog značaja jer se sa starenjem svetske populacije sve više uvećava broj dementnih osoba.

Naša studija predstavlja populaciono genetičko ispitivanje sprovedeno na populaciji studenata. Kvalitet populaciono genetičke studije u mnogome zavisi od veličine uzorka i načina njegove selekcije. Ispitivanjem smo obuhvatili 548 studenata Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu. Većina studenata pripada istoj

generaciji i ima isti nivo obrazovanja (12 godina školovanja, završena četvorogodišnja srednja škola) što analiziranu populaciju čini izuzetno homogenom.

Podaci dobijeni putem upitnika pokazuju da najveći broj studenata svoje uslove života procenjuje kao vrlo dobre (42.8%). Studenti potiču iz porodica u kojima najveći broj majki ima završenu srednju školu (42.5%) dok su očevi fakultetski obrazovani (46.7%). Studenti su takođe davali i ličnu procenu brzine pamćenja pa je većina (60.9%) svoju sposobnost učenja procenilo kao brzu. Prosečna ocena u srednjoj školi je izuzetno visoka i iznosi 4.81 ± 0.41 dok prosečna ocena postignuta na fakultetu iznosi 8.49 ± 1.06 .

Rezultati testova memorijskih sposobnosti ukazuju na statistički značajne razlike srednjih vrednosti pojedinih testova između mladića i devojaka. Mladići imaju statistički značajno bolje rezultate na testovima opštih kognitivnih sposobnosti i radne memorije dok devojke pokazuju statistički značajno bolje rezultate na testu epizodičke memorije - Rey AVLT. Studentkinje su pokazale bolje rezultate i na Wechsler-ovom subtestu logičke memorije ali ta razlika nije dostigla statističku značajnost. Naši rezultati koji ukazuju na razliku među polovima u memorijskim sposobnostima u saglasnosti su sa ranijim studijama. Meta analiza Lynna i Irwing iz 2004. godine koja je obuhvatila 57 studija standardnih i naprednih progresivnih matrica na opštoj populaciji pokazala je da kod dece starosti 6 do 14 godina ne postoji razlika među polovima ali da od 15. godine muškarci postižu bolje rezultate na ovim testovima. Ova razlika se uvećava do perioda od 20. do 29. godine i zatim se održava sve do perioda između 80. i 89. godine kada se razlika među polovima više ne uočava (197).

Decenije istraživanja, od empirijskih do bihevioralnih, ukazuju na snažnu asocijaciju radne memorije i opštih kognitivnih sposobnosti. Rezultati brojnih studija zasnovanih na Bedlijevom modelu radne memorije, ukazuju da postoje velike individualne razlike u kapacitetu radne memorije. Smatra se da je upravo kapacitet radne memorije u stvari faktor X koji se nalazi u osnovi individualnih razlika u nivou intelektualnog funkcionisanja (198). Međutim, ovakvo viđenje još uvek nije univerzalno prihvaćeno. Smatra se da značajna asocijacija radne memorije i inteligencije potiče od mehanizama na kojima se ovi procesi zasnivaju a koji se odvijaju u dorzolateralnim prefrontalnim regionima mozga. Otuda muškarci koji

postizu bolje rezultate na testovima inteligencije postizu bolje rezultate i u testovima radne memorije, što je uočeno i u našoj studiji. Istraživanja Herlitz i sar. pokazala su da razlika među polovima postoji i u funkcionisanju epizodičke memorije i da zavisi prevashodno od vrste materijala koji se pamti. Žene postizu bolje rezultate na testovima verbalne epizodičke memorije kao što su RAVLT i WCHR subtest logičke memorije dok muškarci postizu bolje rezultate na testovima pamćenja prostorno-vizuelnog materijala. U testovima koji obuhvataju oba tipa materijala i prepoznavanje lica pokazano je da žene postizu bolje rezultate (199). Ova zapažanja su takođe u saglasnosti sa našim rezultatima.

Dobijeni rezultati su nam ukazali da dalju analizu ispitivanih polimorfizama moramo vršiti ne samo u celokupnom uzorku već i po polovima kako bi smo došli do adekvatnih zaključaka.

13. ANALIZA BDNF VAL66MET POLIMORFIZMA U POPULACIJI STUDENATA

BDNF pripada familiji neurotrofina čija je osnovna uloga regulacija diferencijacije, proliferacije i preživljavanja neurona. BDNF je uključen u održavanje dugotrajne potencijacije (LTP) modulacijom postsinaptičkih receptora za glutamat a kao retrogradni glasnik reguliše oslobađanje transmitera sa presinapse (200). Polimorfizam rs6265 u genu za BDNF dovodi do zamene valina metioninom u kodonu 66 u regionu proteina ključnom za njegov unutarćelijski transport. Iako ova supstitucija ne utiče na samu aktivnost proteina narušava se njegova sekrecija odnosno pakovanje u odgovarajuće transportne vezikule što za posledicu ima nakupljanje proteina u perinuklearnom prostoru i njegovo nedovoljno prisustvo u dendritima. Usled toga, smatra se da je BDNF Met alel manje efikasan u modulaciji nervne plastičnosti (201).

Tabela 52. Učestalost Val i Met alela u različitim populacijama sveta (202)

Populacija	Val (G)	Met (A)
Srbija-studenti	0.833	0.167
Poljska	0.820	0.180
Nemačka	0.810	0.190
Rusija	0.900	0.100
Afrika	0.986	0.014
Kina	0.510	0.490
Japan	0.580	0.420
SAD	0.788	0.212

U tabeli 52. Prikazane su učestalosti alela Val i Met u populacijama Evrope, SAD, Azije i Afrike (202). U našem ispitivanju učestalost genotipova je Val/Val 69.8%, Val/Met 27% a Met/Met 3.2%. a učestalost polimorfni alela: Val 83.3% a Met 16.7%. Dobijene učestalosti alela i genotipova u saglasnosti su sa rezultatima objavljenim za druge evropske populacije. Populacione studije su pokazale da je približno 30-50% ljudi u svetu heterozigot (Val/Met) ili homozigot za Met alel. (203). Važno je napomenuti da učestalost Met alela značajno varira u različitim populacijama u zavisnosti od porekla i etničke pripadnosti i kreće se između 0 i 70 %. Nosioци Met alela čine približno 30% populacije SAD i najčešće su indo-evropskog porekla. U Japanu i Kini učestalost Met alela je znatno veća i kreće se do skoro 60% u zavisnosti od analizirane populacije. Kognitivni i bihevioralni efekti asocirani sa prisustvom Met alela ispoljavaju se u većoj meri kod kavkazoida. Stoga, većina do danas sprovedenih studija isključuje ispitanike koji nisu evropskog porekla. Moguće je da u ne-evropskim populacijama postoje kompenzatorni mehanizmi koji neutrališu štetan efekat Met alela što bi moglo da objasni tako veliku razliku u učestalosti alela između evropskih i azijskih (drugih) populacija.

Rezultati naše studije pokazuju da je efekat analiziranog polimorfizma specifičan samo za određene memorijske sisteme, posebno epizodičku memoriju. Uticaj na pažnju, radnu memoriju i opšte kognitivne sposobnosti nije uočen. Analiza povezanosti rezultata testova memorijskih sposobnosti i BDNF polimorfizma prilagođeno na pol, obrazovanje roditelja i uslove života, pokazala je da, nasuprot našim očekivanjima, nosioci Met alela postižu statistički značajno bolje rezultate na Vekslerovom subtestu logičke memorije u poređenju sa ispitanicima Val/Val genotipa. U drugom testu epizodičke memorije koji je primenjen- Rey AVLT uočena je statistički značajna razlika u prosečnim vrednostima rezultata testova ali samo kod devojaka. Devojke nosioci Met alela postigle su bolje rezultate na testu dok kod mladića nije uočena statistički značajna razlika. Multipla linearna regresiona analiza u kojoj su kao kovarijate korišćeni pol, uslovi života i obrazovanje roditelja pokazala je da ta uočena razlika zapravo ne potiče od analiziranog genotipa već od uticaja drugih faktora.

Nije utvrđena statistički značajna povezanost BDNF polimorfizma sa sposobnošću učenja studenata kao i sa njihovim uspehom u srednjoj školi i na fakultetu. Sve veći broj studija ukazuje na značajnu ulogu BDNF-a na funkcionisanje memorije, posebno epizodičke (80). Na osnovu rezultata različitih memorijskih testova studije Egan, Dempster i Goldberga ukazuju da nosioci jednog Met alela ili Met homozigoti imaju lošiju verbalnu memoriju u poređenju sa Val homozigotima (201, 204, 205). U prvoj objavljenoj studiji Egan i sar. 2003. godine pokazano je da osobe Val/Val genotipa postižu bolje rezultate na subtestu logičke memorije ali dobijeni rezultati nisu bili prilagođeni na pol i socioekonomski status ispitanika. Studija je obuhvatila 203 osobe obolele od shizofrenije, 303 brata ili sestre obolelih i 133 zdravih kontrola (starosti 18-60 godina). U kontrolnoj grupi pokazano je da su Met homozigoti imali statistički značajno lošije rezultate na Wechsler-ovom subtestu logičke memorije dok na Kalifornijskom testu verbalnog učenja (CVLT) nije uočena značajna razlika. Takođe, nije uočena asocijacija sa semantičkom ili radnom memorijom kao ni sa rezultatima testova opštih kognitivnih sposobnosti. Ovi rezultati ukazuju da analizirani polimorfizam najveći efekat ostvaruje na epizodičku memoriju. Rezultati rada Egan i sar. potvrđeni su u studiji Dempster i sar. 2005. god. i Goldberg i sar. Ove tri grupe su objavile asocijaciju između Met alela i redukovane radne memorije (206). Značajna asocijacija uočena je i između Met alela i sporije obrade informacija (207). U studiji na

kohorti osoba starije životne dobi primećeno je da je prisustvo Met alela asocirano sa lošijim rezultatima kognitivnih testova (208). Statistička značajnost je postignuta za testove odložene memorije, brzine procesovanja i opšte inteligencije što potvrđuje rezultate većine studija u kojima je pronađena asocijacija između ovog gena i kognitivnih sposobnosti. U studiji Tsai i sar. sprovedenoj na kineskoj populaciji uočeno je da među osobama sa nižim koeficijentom inteligencije (IQ) ima značajno više nosilaca Met alela (209).

Studija Harris i sar. na zdravim starijim osobama nije uočila navedenu razliku u memorijskim sposobnostima dok su za fluidnu inteligenciju dobijeni rezultati suprotni od očekivanih: nosioci Met alela postigli su bolje rezultate od nosilaca Val alela (210). Studija je sprovedena na 893 starije osobe škotskog porekla i pokazala je da nosioci Met alela imaju bolje sposobnosti rezonovanja asocirane sa godinama koje su u bliskoj korelaciji sa opštom inteligencijom (210).

Hansell u svojoj studiji sprovedenoj na velikom uzorku mlađih adolescenata nije našao razliku u prostornoj memoriji. U jednom uzorku, Met homozigoti su imali bolje rezultate u fluidnoj inteligenciji, verbalnom rezonovanju ali ne u verbalnoj fluentnosti. Ipak, veličina uzorka u ove tri studije bila je 54 do 233 ispitanika. Nasuprot njima mnogo veća studija sa 785 ispitanika nije potvrdila asocijaciju sa radnom memorijom (211).

Autori su predložili da je Val alel možda asociran sa boljim kognitivnim sposobnostima rano tokom života ali da u starijem životnom dobu doprinosi bržem kognitivnom propadanju.

Razlog za ovako oprečne rezultate još uvek je nepoznat. Smatra se da su faktori kao što su starost analizirane populacije, pol, sociodemografski faktori, tip testova i etnička pripadnost značajno različiti u navedenim studijama.

Novije studije pokazale su i uticaj Val66Met polimorfizma na varijaciju u morfologiji hipokampusa i parahipokampalnog girusa kod normalnih osoba i osoba obolelih od shizofrenije. (212). Kod nosilaca Met alela primećena je razlika u morfologiji hipokampusa i korteksa. Pokazano je da kod se kod njih javlja smanjena zapremina dorzolateralnog prefrontalnog korteksa, regiona odgovornog za planiranje i više kognitivne funkcije kao i subkortikalnih regiona kao što je jedro

kaudatuma (74). Kod zdravih odraslih osoba, nosilaca Met alela, uočena je 4% do 11% manja zapremina hipokampusa (208, 213). Rezultati funkcionalne magnetne rezonance još uvek su kontraverzni. U pomenutoj studiji Egan i sar. iz 2003. god. Met alel asociran je sa abnormalnom aktivacijom hipokampusa (201).

Nasuprot njima studija Dennis i sar. je obuhvatila 22 osobe mlađe životne dobi (prosečne starosti 22.5 god.) a ispitivana je neuralna aktivnost tokom procesa epizodičke memorije u zavisnosti od BDNF genotipa (214). Nakon što su isključene razlike u kognitivnim sposobnostima i zapremini medijalnog temporalnog lobusa dobijeni rezultati bili su oprečni rezultatima Hairiri i saradnika iz 2003. god (57). U poređenju sa Val homozigotima nosioci Met alela su imali značajno veću aktivnost u medijalnom temporalnom lobusu (MTL). Ovo je posebno izraženo u levom anteriornom parahipokampalnom girusu (PHG) i desnom hipokampusu/PHG tokom procesa kodiranja i desnom posteriornom hipokampusu/PHG tokom procesa prisećanja događaja. Odnos između rezultata dobijenih primenom testova memorijskih sposobnosti i unutrašnjih kognitivnih procesa (neuronska aktivnost) još uvek je teško interpretirati. Jedno od mogućih objašnjenja je da nosioci Met alela moraju da ulože veći napor kako bi postigli iste rezultate na testovima memorijskih sposobnosti kao i Val/Val homozigoti. Nasuprot tome moguće je da povećana aktivacija u MTL zapravo predstavlja bolju epizodičku memoriju koja nije detektovana testovima memorijskih sposobnosti. Na kraju, moguće je da je ova povećana aktivacija MTL posledica nedovoljne efikasnosti neurona što ne daje nikakvu prednost u epizodičkoj memoriji već dovodi do istih rezultata. Buduće studije treba da otkriju da li je povećana aktivnost u MTL, posebno u hipokampusu, prednost ili kompenzatorni mehanizam i da razjasni funkcionalnost ovog mehanizma tokom života zdravih osoba i pacijenata koji pokazuju kompromitovanu aktivnost MTL-a.

Za dalja razmatranja razlika u kognitivnim funkcijama potrebno je imati veći broj osoba koje su homozigoti za Met alel a koje predstavljaju samo oko 4% populacije.

14. ANALIZA KIBRA POLIMORFIZMA U POPULACIJI STUDENATA

KIBRA protein se predominantno eksprimira u mozgu i bubrezima. U mozgu njegova ekspresija je posebno izražena u regionima povezanim sa memorijskim sposobnostima kao što su hipokampus, korteks, cerebellum i hipotalamus. KIBRA učestvuje u brojnim ćelijskim funkcijama: migraciji ćelija, vezikularnom transportu, regulaciji transkripcije i sinaptogenezi (215). Pokazano je da interaguje sa postsinaptičkim proteinima dendrinom i sinaptopodinom koji učestvuju u organizaciji citoskeleta u dendritima (216). Najjači dokaz o ulozi KIBRA u memorijskim procesima potiče od interakcije sa protein kinazom C ζ , molekulom ključnim u procesu dugotrajne potencijacije. Takođe, dokazana je i interakcija sa PKM ζ , koja se konstitutivno eksprimira u hipokampusu (217). Pokazano je da su oba ova proteina prisutna u hipokampusu i dentatnom girusu koji su od ključnog značaja za procese učenja i pamćenja.

U našem ispitivanju analizom je obuhvaćeno 538 studenata. Utvrđeno je da je 260 studenata tj. 48.3% homozigot za češći alel C (genotip CC), 231-oro tj. 42.9% su heterozigoti (genotip CT) a njih 47 (8.7%) je homozigot za ređi alel T (genotip TT). Naši rezultati su u saglasnosti sa rezultatima učestalosti genotipova i alela u drugim evropskim populacijama. Primećeno je da se učestalost C i T alela značajno razlikuju među svetskim populacijama. Učestalost T alela je veća u afričkim populacijama u odnosu na evropske a znatno veća u japanskoj populaciji (Tabela 53.).

Tabela 53. Učestalost C i T alela u populacijama sveta (202)

Populacija	Alel C	Alel T
Srbija-studenti	0.698	0.302
Evropa-ukupno	0.649	0.351
Italija-Toskana	0.648	0.352
Španija	0.643	0.357
Japan	0.152	0.848
Afrika	0.400	0.600
SAD	0.494	0.506

U našoj studiji nije uočena asocijacija KIBRA genotipa sa radnom memorijom, pažnjom, i opštim kognitivnim sposobnostima kao i testovima epizodičke memorije čak i kada su rezultati prilagođeni na pol, obrazovanje roditelja i uslove života. Primena multiple linearne regresione analize pokazala je da statistički značajna razlika koja je uočena u rezultatima RavenPM kod muškaraca i RAVLT kod žena ne potiče od genotipa već od uticaja drugih kovarijata. Ispitivana je i asocijacija KIBRA genotipa sa postignutim uspehom tokom školovanja (prosečna ocena u srednjoj školi i na fakultetu), ličnom procenom o brzini pamćenja i brojem ponavljanja gradiva prilikom pripremanja ispita i nije uočena statistički značajna povezanost.

U GWA studiji Papatropoulosa i saradnika po prvi put je polimorfizam rs17070145 koji predstavlja supstituciju T u C u devetom intronu gena za KIBRA protein asociiran sa epizodičkom memorijom (54). Studija Papatropoulos-a i sar. najpre je sprovedena na 351 osoba starosti 18-48 godina koji su deo švajcarske kohorte i uočena je asocijacija T alela sa boljim rezultatima testova verbalne memorije. Drugu grupu ispitanika činilo je 256 odraslih osoba iz SAD i pokazano je da nosioci T alela imaju bolje rezultate na RAVLT testu epizodičke memorije i Buschke testu selektivnog prisećanja. Treći uzorak obuhvatio je novu grupu od 424 osobe iz Švajcarske, starosti od 18 do 28 godina kod kojih je uočeno da nosioci T alela pokazuju bolje rezultate na testu semantički nepovezanih slika ali samo prilikom testiranja odloženog pamćenja. Ni

u jednoj kohorti nije uočena asocijacija sa procesima pažnje, radne memorije niti neposrednog prisećanja informacija. Rezultati dobijeni u ovoj studiji ukazali su da je KIBRA specifičan protein za koji je moguće da utiče na procese zadržavanja informacija ali koji ne utiče na kratkotrajno pamćenje. Sa KIBRA genotipom bilo je asocirano učenje i verbalnih i vizuelnih nepovezanih informacija. To je navelo na zaključak da funkcija KIBRA-e ne zavisi od prirode stimulusa. Rezultati funkcionalne magnetne rezonance (fMRI) pokazali su da je moždana aktivnost tokom testova epizodičke memorije bila značajno veća u regionima mozga ključnim za prizivanje informacija kod CC homozigota u poređenju sa nosiocima T alela.

Nakon studije Papassotiropoulos-a i sar. objavljena je studija Schaper i saradnika na malom uzorku od 64 osobe u kojoj je uočen trend ka boljim rezultatima odloženog prisećanja u nemačkoj verziji AVLT kao i značajna asocijacija KIBRA genotipa sa neposrednim i odloženim pamćenjem (218). Sledile su brojne studije u kojima je takođe uočena asocijacija sa odloženim pamćenjem kao što su studije Almeida i sar., 2008., Preuschof i sar., 2010. i Vassos i sar., 2010 (219, 220, 221).

Studija Nacmias i sar. 2010. dobila je suprotne rezultate ali analiziranu grupu činile su osobe sa subjektivnim žalbama na pamćenje (222). To je ukazalo na mogućnost da KIBRA genotip može na memoriju da utiče različito kod osoba koji imaju deficit u memorijskim sposobnostima u odnosu na osobe normalnih memorijskih sposobnosti.

Sa druge strane, Need i saradnici su pokušali da reprodukuju studiju Papassotiropoulosa i sar. na dve kohorte ispitanika evropskog porekla koje je činilo 319 i 365 osoba (223). U svojoj studiji primenili su regresioni model u kome su kovariate bile rs17070145 genotip, pol, godine i obrazovanje i nisu potvrdili asocijaciju KIBRA genotipa sa verbalnom memorijom u grupi od 319 ispitanika. Takođe, isti rezultat su dobili i podgrupi od 76 ispitanika koji su radili test neposrednog i odloženog pamćenja (prisećanja) priče nisu otkrili statistički značajnu asocijaciju. Ispitivanja epizodičke memorije sprovedena na prvoj kohorti nisu pokazala asocijaciju sa KIBRA genotipom ali nisu bili egzaktna replikacija studije Papassotiropoulosa i sar. Zbog toga je u drugoj kohorti koju je činilo 365 osoba nemačkog porekla primenjen AVLT. Ponovo nije uočena asocijacija epizodičke memorije sa KIBRA genotipom. Analizirano je još 39

polimorfizma u KIBRA genu: samo jedan je dosegao nominalnu značajnost i nije u LD (neravnoteža vezanosti, engl. linkage disequilibrium) sa rs17070145.

Bates i sar. 2009.god. su sproveli istraživanje na dve grupe (224). Jednu je činilo 2091 osoba opšte populacije koja je učestvovala u kliničkoj studiji koja predstavlja repliku studije Papassotiropoulos-a i sar. dok je drugu grupu činilo 542 ispitanika, učesnika studije o normalnom starenju koji su radili Wechslerov subtest logičke memorije. Ovakav pristup omogućio je ispitivanje trenutne i odložene memorije za nepovezane i povezane informacije. Ispitanici su takođe radili i RavenPM test opštih kognitivnih sposobnosti. Njihovi rezultati nisu pokazali asocijaciju rezultata subtesta logičke memorije sa KIBRA genotipom ni kada su rezultati prilagođeni na pol i neposredno upamćivanje. Dobijene vrednosti prilagođene su i na COMT Val158Met polimorfizam i KLOTHO, nicastrin (NCSTN) i APOE genotip i rezultati su ostali nepromenjeni. Takođe, nije uočena ni asocijacija između KIBRA genotipa i rezultata testa inteligencije što je u saglasnosti sa našim rezultatom. Ispitivanje asocijacije genotipa sa rezultatima AVLT otkrilo je statističku značajnost asocijacije genotipa i odloženog prisećanja informacija nakon 30 minuta kada su rezultati prilagođeni na pol, starost i neposredno upamćivanje. Dobijeni rezultati ukazuju da je efekat KIBRA-e na memorijske sposobnosti skroman i specifičan za određene kognitivne komponente memorije.

Milnik i sar. 2012. god. su u meta analizu uključili sve dostupne studije asocijacije koje su ispitivale efekat rs17070145 polimorfizma na epizodičku i radnu memoriju (225). Obuhvaćeno je sedamnaest studija sa ukupno 8909 ispitanika koje su ispitivale efekat na epizodičku memoriju i 9 studija sa ukupno 4696 ispitanika u kojima je ispitivana radna memorija. Dobijeni rezultati pokazali su da postoji statistički značajna asocijacija analiziranog polimorfizma i sa epizodičkom i sa radnom memorijom. Rezultati ukazuju da rs17070145 polimorfizam objašnjava 0.5% varijanse u zadacima epizodičke memorije i 0.1% varijanse u zadacima radne memorije kod ispitanika prevashodno kavkazoidnog porekla.

Studija Burgess i sar. sprovedena je na 2571 pacijenata sa AB kasnog početka i 2842 kontrole koja je obuhvatila osobe evropskog i afro-američkog porekla (226). U kontrolnom uzorku nije uočena asocijacija sa epizodičkom memorijom primenom

RAVLT i Wekslerovog subtesta logičke memorije. Takođe meta analiza sa preko 8000 ispitanika pokazala je da T alelima protektivni efekat od AB. Pored toga, pokazano je da postoji prekomerna ekspresija KIBRA-e u temporalnom korteksu pacijenata sa AB ali ne i u cerebelumu.

15. ANALIZA APOE POLIMORFIZAMA U POPULACIJI STUDENATA

Apolipoprotein E (ApoE) je strukturni protein LDL čestica i služi kao ligand za LDL receptor. U mozgu se sintetiše primarno u astrocitima i učestvuje u transportu holesterola između ćelija glije i neurona pa ima značajnu ulogu u održavanju sinapsi i nervnoj plastičnosti (227). Smatra se da se u gliji holesterol reciklira, kombinuje sa ApoE i šalje neuronima gde se koristi u remodeliranju sinapsi i izrastanju dendrita. U humanoj populaciji prisutna su tri uobičajena kodominantna alela: E2, E3, i E4 koji kodiraju glavne proteinske izoforme apoE (E2, E3 i E4). Opisane alelne varijante su uslovljene baznim supstitucijama u kodonima 112 i 158 egzona 4 i njihovim kombinacijama (122). APOE E4 je dobro poznat faktor rizika za Alchajmerovu bolest kod koje je jedan od simptoma i memorijski deficit (229). Najveći broj studija uticaja APOE E4 alela na memorijske sposobnosti sproveden je na populaciji dementnih osoba i zdravih osoba starije životne dobi. U brojnim radovima kod osoba srednje ili starije životne dobi APOE E4 je asociran sa slabijim memorijskim sposobnostima čiji je mogući uzrok izmenjeni metabolizam holesterola (230). Mnogo manje je podataka o njegovom uticaju na zdrave mlade osobe.

Tabela 54. Učestalost E2, E3 i E4 alela u različitim populacijama sveta (202)

Populacija	E2	E3	E4
Srbija-studenti	0.056	0.879	0.065
Srbija-JUSAD	0.067	0.863	0.070
Srbija (228)	0.147	0.742	0.111
Hrvatska	0.069	0.787	0.144
Mađarska	0.064	0.807	0.129
Finska	0.039	0.807	0.129
Francuska	0.087	0.782	0.131
Nemačka	0.082	0.782	0.136
Španija	0.075	0.849	0.075
Turska	0.061	0.860	0.079
SAD (Framingam)	0.072	0.786	0.140
Japan	0.023	0.891	0.086
Kina	0.124	0.806	0.070

U tabeli 54. prikazane su učestalosti alela e2, e3 i e4 u populacijama Evrope, SAD i Azije. U našem ispitivanju redosled učestalosti polimorfnih alela je E3 (87.9%)>E4 (6.5%)>E2 (5.6%) dok je učestalost genotipova je E3/E3 (77.7%)>E3/E4+E4/E4 (11.1%)>E2/E3 (10.1%). Dobijeni redosled genotipova i alela u našoj studiji u saglasnosti je sa redosledom opisanim u populacijama belaca.

Učestalost alela i genotipova takođe je u skladu sa rezultatima JUSAD studije (Jugoslovenska studija prekursora ateroskleroze kod školske dece) sprovedene na 530 učenika osmog razreda iz različitih regiona Srbije (231). Dobijeni rezultati obe studije najviše su u skladu sa rezultatima objavljenim za Tursku populaciju. Dobijena učestalost E4 alela je niža od učestalosti u Mediteranskim zemljama i vrlo bliska učestalosti u azijskim populacijama.

Rezultati naše studije pokazali su da ne postoji statistički značajna razlika u memorijskim i opštim kognitivnim sposobnostima studenata (ukupno i po polovima) u zavisnosti od njihovog APOE genotipa. Međutim, možemo uočiti da su, iako nije dostignuta statistička značajnost, studenti nosioci e4 alela postigli lošije rezultate u svim testovima memorijskih sposobnosti kao i testu opštih kognitivnih sposobnosti. Takođe, primenom multiple linearne regresije nije uočena asocijacija između APOE genotipa i memorijskih i opštih kognitivnih sposobnosti ni kada su rezultati prilagođeni na pol, uslove života i obrazovanje roditelja.

U našoj studiji primenom multiple linearne i logističke regresione analize ispitivali smo i uticaj APOE genotipa na uspeh u srednjoj školi i fakultetu kao i na ličnu procenu brzine pamćenja i broj ponavljanja materijala pre izlaska na ispit i nismo uočili statistički značajnu asocijaciju sa APOE genotipom.

U studiji Mondadori i sar. uočena je asocijacija E4 alela sa boljim memorijskim sposobnostima u mlađem životnom dobu, posebno sa epizodičkom memorijom (232). Takođe u studiji Hubachek i sar. uočeno je da osobe nosioci E4 alela postižu viši nivo obrazovanja (233) dok rezultati Yu, Lin, 2000 ukazuju da oni čak imaju i bolje opšte kognitivne sposobnosti (234). U radu Han, Drake i saradnika ukazano da mlađe osobe koje su nosioci E4 alela imaju bolju pažnju, egzekutivne funkcije i epizodičku memoriju u poređenju sa osobama koje nemaju E4 alel. Iako su ispitanici u okviru ove studije imali blagu do umerenu traumatu mozga rezultati su ostali neizmenjeni i kada je uzeta u obzir težina povrede (235).

Na osnovu navedenih rezultata u kojima nosioci APOE4 alela u mlađoj životnoj dobi imaju bolje memorijske sposobnosti Han i Bondi (236) su predložili koncept antagonističke plejotropije. Ovaj koncept odnosi se na gene koji pokazuju pozitivne efekte rano tokom života čime doprinose pozitivnoj selekciji i preživljavanju ali tokom kasnijeg perioda života imaju negativan efekat. Han i Bondi smatraju da je APOE4 alel u mladosti asociran sa boljim kognitivnim sposobnostima, u srednjem životnom dobu varijacija između nosilaca E4 alela i onih koji nemaju ovaj alel je minimalna dok je u starijem životnom dobu asocijacija obrnuta i APOE4 alel postaje faktor rizika za poremećaje u kognitivnim sposobnostima i pojavu demencije. Među navedenim studijama na kojima ovaj koncept počiva samo studija Mondadori i saradnika je

uključila 340 ispitanika dok su ostale studije imale mali broj ispitanika, uključivale su ispitanike sa nekom vrstom patologije a umesto direktne procene memorijskih sposobnosti nekim od odgovarajućih testova mnoge su koristile nivo obrazovanja ili temperament za meru kognitivnih sposobnosti.

Danas su sve brojnije studije u kojima se došlo do oprečnih rezultata. Jorm i sar. nisu uočili razliku u asocijacije između APOE genotipa i kognitivnih sposobnosti u kohortama od 20-24, 40-44 60-64 godina starosti (237).

U studiji Liu i sar. 2010 analizirano je 2208 ispitanika koji su podeljeni u grupe mlađih i starijih od 50 godina (238). Rezultati ove studije pokazali su da je E4 alel udružen sa lošijim rezultatima AVLT testa u grupi osoba starijih od 50 godina. Prvi, rani efekti uočeni su kod homozigota, genotipa E4/E4 starosti 40 godina. Prilikom istraživanja u obzir su uzeti i kardiovaskularni faktori i uočena je jaka asocijacija između APOE4 alela i viših vrednosti ukupnog holesterola, triglicerida i HDL. Debljina tunike intime i tunike medije karotidne arterije (intima media thickness, IMT) i sistolni krvni pritisak su takođe asociirani sa kognitivnim funkcijama. Ipak, prilagođavanje na ove faktore u multiploj regresionoj analizi nije imalo uticaja na asocijaciju APOE4 sa kognitivnim funkcijama što ukazuje da je uticaj APOE4 alela nezavisan od kardiovaskularnih faktora.

Najveća do sada sprovedena studija je studija Bunce i saradnika iz 2011. godine koja je obuhvatila 5445 ispitanika svrstanih u tri starosne kategorije 20-24, 40-44 i 60-64 godine (239). U ovoj studiji nije uočena asocijacija E4 alela sa boljim kognitivnim funkcijama mladih i sredovečnih osoba i nakon što su rezultati prilagođeni na pol i godine obrazovanja.

Ihle i sar. su 2012 objavili rezultate meta analize koja je obuhvatila 20 studija u kojima je ispitivan uticaj APOE4 alela na kognitivne sposobnosti dece, adolescenata i mladih odraslih osoba (240). Analizom dobijenih rezultata nije uočeno postojanje kognitivnog benefita kod mladih osoba adolescenata i dece koja su nosioci E4 alela i zaključuju da se hipoteza o antagonističkoj plejotropiji treba uzeti sa rezervom. Rezultati obe studije su u saglasnosti sa našim rezultatima.

Sprovedena je i opsežna studija na uzorku od 5995 dece (241). Opšte kognitivne sposobnosti određivane su na uzrastu od 8 godina, memorijske sposobnosti u starosti od

8 i 10 godina a takođe je analiziran i lipidni status dece. Dok je lipidni status pokazivao istu zavisnost od APOE genotipa kao i kod odraslih asocijacija sa opštim kognitivnim sposobnostima i rezultatima testova memorijskih sposobnosti nije uočena.

Mali broj istraživanja sproveden je u cilju proučavanja uticaja APOE genotipa na strukturu i funkciju mozga zdravih mladih osoba. Studije funkcionalnih, strukturnih i bihevioralnih razlika asociiranih sa APOE genotipom fokusirane su na proučavanje medijanog temporalnog lobusa kao regiona mozga koji je značajan za funkcionisanje epizodičke memorije i koji je prvi zahvaćen AB. Pokazano je da kod starijih osoba dolazi do progresivnog smanjenja zapremine hipokampusa, s tim što je ono najmanje izraženo kod osoba koje nemaju demenciju, nešto više prisutno kod onih sa blagim kognitivnim poremećajem, a najizraženije je kod obolelih od AB. U svakoj od analiziranih grupa ispitanici sa E4 alelom imali su statistički značajno manju zapreminu hipokampusa u poređenju sa onima koji nemaju E4 alel. Ovi rezultati u saglasnosti su sa radovima u kojima je uočena redukcija u zapremini hipokampusa i debljini korteksa nosilaca E4 alela u populaciji zdravih sredovečnih i starijih osoba. Kod dece i adolescenata uočena je povezanost E4 alela sa manjom debljinom entorinalnog korteksa. Iako nisu sve studije pokazale da postoji povezanost između E4 alela i redukcije zapremine hipokampusa meta analiza koja je obuhvatila 84 studije došla je do zapažanja da je kod zdravih odraslih osoba zapremina desne strane veća od zapremine leve strane hipokampusa (243). Kod zdravih starijih nosilaca E4 alela uočeno je da dolazi do narušavanja asimetrije hipokampusa (244) usled smanjenja zapremina desne strane hipokampusa. (245) Predloženo je da promene u normalnoj asimetriji mogu biti potencijalni indikator rane patologije karakteristične za AB. Dobijeni rezultati istraživanja sprovedenog na osobama mlađe životne dobi ukazuju da i kod mladih nosilaca E4 alela postoji smanjenje zapremine hipokampusa i da je desna strana podložnija atrofiji u poređenju sa levom. Razlika u zapremini uočena je i kod desne amigdale ali nije dostigla statističku značajnost. U zapremini sive mase drugih struktura mozga nije uočena razlika. Zajedno ovi rezultati ukazuju da prisustvo E4 alela nema globalni uticaj već specifično deluje na strukture hipokampusa. Uprkos negativnim efektima E4 alela na zapreminu hipokampusa E4 nosioci postižu iste rezultate na testovima verbalnog učenja, vizuelne memorije, radne memorije i pažnje kao i osobe koje nemaju E4 alel. To znači da iako je prisutna rana atrofija u strukturama za koje je

poznato da su zahvaćene u ranoj fazi AB memorijske sposobnosti još uvek nisu narušene odnosno, mozak ima dovoljno kapaciteta da spreči kognitivni pad uprkos razlikama u strukturi hipokampusa. Deficit asociran sa E4 alelom postaje uočljiv u starijem životnom dobu kada je kod nosilaca E4 alela tanjenje korteksa primećeno u AB izraženije pa brže dolazi do pada ispod kritične anatomske granice i disfunkcija postaje klinički uočljiva.

U studiji Dennis i sar. 2010. godine koja je obuhvatila 24 mlade odrasle osobe (12 nosilaca E4 alela) ispitivana je aktivacija hipokampusa ESA (engl. encoding success activity) (246). Dobijeni rezultati pokazali su da nosioci E4 alela imaju veću aktivnost u medijalnom temporalnom lobusu, posebno hipokampusu i parahipokampalnom girusu (PGH) ali da se globalno uočava redukovana konektivnost sa drugim kortikalnim regionima mozga koji se aktiviraju prilikom izvođenja odgovarajućeg zadatka. Treba imati u vidu da nije postojala razlika u memorijskim sposobnostima između analiziranih grupa. Ovi rezultati nisu u saglasnosti sa postavljenom hipotezom o antagonističkoj plejotropiji i ulozi APOE4 alela u kognitivnim sposobnostima mladih zdravih osoba. Smatra se da pojačana aktivacija kod nosilaca APOE4 alela (u odsustvu bihevioralnih i strukturnih razlika) zapravo predstavlja kompenzatorni mehanizam. Dodatna aktivacija kod nosilaca e4 alela reflektuje dodatni kognitivni napor prilikom izvršenja memorijskih zadataka kako bi se ostvario isti nivo funkcionisanja kao kod onih osoba koje nisu nosioci E4 alela. Povećana aktivacija u medijalnom temporalnom lobusu koja je detektovana u ovoj studiji odražava urođenu razliku u funkcionisanju ovog regiona mozga između onih koji imaju E4 alel i onih koji ga nemaju ili se pak objašnjava kao predklinički stadijum Alchajmerove bolesti (230). I dalje nema odgovora da li je u pitanju drugačiji kognitivni fenotip kod mladih osoba nosilaca APOE E4 alela ili razlike u memorijskim sposobnostima ukazuju na predklinički stadijum AB.

U studiji Reiman i sar. 2003. godine primenom fluorodeoksiglucoza pozitronske emisije tomografije ispitivan je metabolizam glukoze u mozgu u zavisnosti od ApoE genotipa kod zdravih osoba starosti 20-39 godina (247). Kao i u prethodnim studijama sprovedenim na ispitanicima srednjeg životnog doba i pacijentima sa mogućom dijagnozom AB pokazano je da i mlade osobe nosioci E4 alela imaju abnormalno nizak nivo metabolizma glukoze bilateralno u zadnjem cingulumu, parietalnom, temporalnom

i prefrontalnom korteksu. Kognitivno normalni nosioci E4 alela imaju funkcionalne abnormalnosti u mladosti nekoliko decenija pre moguće pojave demencije. Ove abnormalnosti su detektovane kod nosilaca samo jednog E4 alela kod kojih se AB tipično javlja u sedmoj deceniji života, četiri decenije više u odnosu na prosečno godište ispitanika uključenih u studiju. Moguće je da je redukcija u metabolizmu glukoze kod mladih nosilaca APOE4 genotipa najranija promena u mozgu osoba koje imaju rizik za oboljevanje od AB.

16. ANALIZA BCHE POLIMORFIZMA U POPULACIJI STUDENATA

BCHE pripada familiji serin proteaza i katalizuje hidrolizu endogenih estara holina kao što su acetilholin, propionilholin i butirilholin. U CNS-u se ekspirira u korteksu, hipokampusu i talamusu, regionima mozga značajnim za ostvarivanje različitih kognitivnih funkcija za koje je poznato da imaju holinergičku inervaciju. Brojna jedra talamusa, uključujući anteroventralno, mediodorzalno i pulvinarno sadrže veliki broj neurona koji predominantno ekspiriraju BchE (175). Ova jedra deo su talamokortikalnih kola koja su od značaja za više kognitivne funkcije, uključujući brzinu obrade informacija, memoriju i vizuospacijalne funkcije (248). Smatra se da BCHE učestvuje u koregulaciji holinergičke transmisije zajedno sa AchE ali i da ima ulogu u regulaciji ne-holinergičke transmisije. U okviru gena za BCHE nalazi se čak 40 polimorfni mesta za koje je pokazano da dovode do smanjene aktivnosti enzima u poređenju sa wt BCHE. Najčešća je BCHE-K varijanta (rs1803274) koja nastaje baznom supstitucijom A u G na poziciji 1699 i dovodi do zamene alanina treoninom u 539-om kodonu. Posledica ove supstitucije je smanjena hidrolitička aktivnost enzima za 30% usled narušavanja njegove stabilnosti (249). Funkcionalni značaj BCHE je dugo godina bio potcenjen zbog njegove relativno niske ekspresije u poređenju sa ACHE. Od svih polimorfizama u BCHE genu K varijanta privukla je najviše pažnje kada su Lehmann i sar. 2001. god. ukazali na mogućnost da ova varijanta predstavlja faktor rizika za AB (180). Smatra se da smanjena hidrolitička aktivnost BchE vodi boljoj holinergičkoj transmisiji što utiče na bolje memorijske sposobnosti, pažnju, manje kognitivno propadanje tokom godina i odlaganja početka AB (250). Kod pacijenata sa AB ekspresija BCHE znatno raste u hipokampusu i temporalnom korteksu u poređenju

sa normalnim osobama (251). S druge strane BChE-K favorizuje stvaranje neurofibrilarnih klubadi tokom rane faze AB i ukazuje na uticaj BChE-K još tokom rane, asimptomatske faze bolesti (252). Dosadašnja istraživanja ukazuju da BChE-K može imati i protektivnu ulogu ali i biti faktor rizika za AB u zavisnosti od delovanja ostalih varijabli. Poznato je da Ach učestvuje u sinaptičkoj plastičnosti hipokampusa, učenju i memorijskim procesima. Greig i saradnici su 2005. godine ispitali efekat inhibicije BChE na procese učenja i kognicije na sinaptičkom i bihevioralnom nivou kao i uticaj na neuropatološke markere AB i nivo Ach (253). Njihovi rezultati su pokazali da inhibicija BChE povećava nivo Ach u parijetalnom korteksu pacova, pojačava LTP u hipokampusu, poboljšava nivo kognitivnih sposobnosti kod starijih pacova i redukuje nivo APP i A β *in vitro* i *in vivo*. Promene u koncentraciji Ach utiču na dugotrajnu potencijaciju modulacijom glutamatergičke neurotransmisije. Iako je LTP pojava koja se najčešće ostvaruje na glutamatergičkim sinapsama savremene studije ukazuju da na holinergičkim neuronima postoji slična plastičnost (jačanje sinapsi holinergičkih neurona). Smatra se da uticaj holinergičkih neurona na procese učenja i pamćenja može biti i direktan i da se ne ostvaruje samo putem modulacije glutamatergičkih sinapsi. Za sada nije potpuno jasno da li uloga BChE u kognitivnim sposobnostima potiče samo od njene holinergičke ili ne-holinergičke funkcije. Novije studije na ljudima podržavaju moguću ulogu BChE u kognitivnim funkcijama. Uočeno je da pacijenti sa demencijom, nosioci K varijante, imaju bolju pažnju i sporiju progresiju bolesti. Takođe, kod demencije sa Lewijevim telima uočena je visoko značajna asocijacija između niže aktivnosti Bche u temporalnom korteksu i sporijeg kognitivnog propadanja. BChE pozitivni neuroni koji se projektuju specifično na frontalni korteks mogu imati važnu ulogu u pažnji, egzekutivnim funkcijama, emocionalnoj memoriji i ponašanju. Uticaj BChE na memorijske sposobnosti osoba mlađe životne dobi još uvek nije ispitan. Prema našim saznanjima naša studija je prva koja se bavila ispitivanjem uticaja K varijante na memorijske sposobnosti mladih, zdravih osoba.

Tabela 55. Učestalost G i A alela (K varijante) u različitim populacijama sveta (202)

populacija	G alel	A alel (K varijanta)
Srbija-studenti	0.815	0.185
Evropa-ukupno	0.813	0.187
Finska	0.855	0.145
Španija	0.857	0.143
Velika Britanija	0.798	0.202
Afrika	0.860	0.140
Japan	0.792	0.208
Kina	0.840	0.160
SAD	0.870	0.130

U tabeli 55. prikazana je učestalost alela ispitivanog BCHE polimorfizma. Može se primetiti da ne postoji značajna razlika u učestalosti K varijante u različitim populacijama u svetu. U našoj studiji kojom je obuhvaćeno 543 studenta utvrđeno je da je 363 studenata tj. 66.8% homozigot za češći alel G (genotip GG), 159-oro tj. 29.3% su heterozigoti (genotip GA) a svega njih 21 (3.9%) je homozigot za ređi alel A (genotip AA). Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa rezultatima objavljenim za ostale populacije u svetu.

Rezultati naše studije pokazali su da studenti nosioci K varijante postižu statistički značajno bolje rezultate na testu pažnje/radne memorije u poređenju sa homozigotima genotipa GG. U testovima opštih kognitivnih sposobnosti i epizodičke memorije nije uočena asocijacija sa BCHE genotipom niti prisustvom K alela. Kada je analizirana asocijacija BCHe genotipa sa uspehom postignutim u srednjoj školi i na fakultetu pokazalo se da i kada je analiza vršena po genotipskom i po alelskom modelu, nosioci K varijante imaju višu prosečnu ocenu tokom studiranja. Takođe, ispitivali smo asocijaciju BCHE genotipa i sa ličnom procenom studenata o brzini učenja kao i koliko puta prelaze gradivo za ispit i nismo uočili statističku značajnost.

Značajno je pomenuti i rezultate Manahoran i sar. koji su ispitivali uticaj silent varijante enzima L307P na kognitivne sposobnosti (254). U studiji su primenili bateriju testova ANAM (engl. Automated Neuropsychological Assessment matrices). Njihovi rezultati pokazali su da su nosioci silent varijante bili bolji u testovima "simple reaction time" ali sporiji u "visual perceptual matching task". Potrebne su dodatne studije na većem broju ispitanika kako bi se rezultati naše studije i potvrdili.

Dosadašnji rezultati ukazuju da fokusiranje na postojeće, dobro proučene biološke informacije vode identifikaciji gena značajnih za memorijske sposobnosti ljudi. Postojeće biološke informacije značajno olakšavaju potragu za genima kandidatima ali sa druge strane ograničavaju potencijal studija da identifikuju nove gene i molekularne puteve. Skorija dostignuća u tehnološkom razvoju omogućila su analizu asocijacija između određenih osobina i miliona genetskih varijanti raspoređenih po celokupnom genomu primenom studija asocijacije celokupnog genoma (GWAS). Pored izuzetnog značaja replikacije rezultata dobijenih asocijativnim studijama potrebno je uzeti u obzir i dodatne metode koje bi dalje mogle potvrditi i omogućiti bolje razumevanje dobijenih rezultata. Jedna od tih metoda je i primena imidžing studija. Do sada, većina ovih studija ispitivala je asocijaciju pojedinačnih genskih markera sa moždanom aktivnošću. Ipak, uzimajući u obzir genetičku i fenotipsku kompleksnost memorije biće potrebno istovremeno analizirati markere u većem broju gena. Takođe, od velikog je značaja uzeti u obzir i interakcije među genima.

Pored molekularno-genetičkih ispitivanja o ulozi gena u individualnim razlikama u memorijskim sposobnostima ljudi važno je i razumevanje efekta demografskih i socioekonomskih faktora na razvoj i funkciju memorijskih sposobnosti. Poznato je da uslovi života, obrazovanje ispitanika, životni stil bitno utiču na nivo memorijskih sposobnosti. Takođe, važno je imati u vidu i emocionalno stanje ispitanika prilikom izvođenja testova memorijskih sposobnosti kao i stepen njihove motivacije jer mogu bitno uticati na postignute rezultate.

ZAKLJUČAK

U ispitivanom uzorku od 548 studenata, između mladića i devojaka su uočene razlike u rezultatima koje su postigli prilikom rešavanja baterije neuropsiholoških testova. Mladići su postigli statistički značajno bolje rezultate na testu opštih kognitivnih sposobnosti – RavenPM kao i na testu pažnje/radne memorije TRCmax dok su devojke postigle statistički značajno bolje rezultate na testu epizodičke memorije REYcummm.

Ispitivanjem BDNF rs6265 polimorfizma pokazano je:

➤ da je učestalost GG homozigota 69.8%, heterozigota GA 27.0 % i AA homozigota 3.2%. Između mladića i devojaka nije uočena statistički značajna razlika u učestalosti genotipova. Učestalost alela G je 83.3%, a alela A 16.7%.

➤ da je uočena statistički značajna povezanost A alela sa boljim rezultatima postignutim na ABimed testu epizodičke memorije nakon prilagođavanja na pol, obrazovanje roditelja i uslove života studenata.

➤ da između nosilaca GG i GA genotipa nije uočena statistički značajna razlika u rezultatima postignutim na testovima: RavenPM, TRCmax i REYcummm

➤ da između nosilaca GG i GA genotipa nije uočena statistički značajna razlika u prosečnoj oceni postignutoj tokom srednje škole i prosečnoj oceni na fakultetu

➤ da između nosilaca GG i GA genotipa nije uočena statistički značajna razlika u ličnoj proceni o brzini pamćenja i tome koliko puta student ponavljaju gradivo pre izlaska na ispit.

Ispitivanjem KIBRA rs17070145 polimorfizma pokazano je:

➤ da je 48.3% studenata homozigot za češći alel C (genotip CC), 42.9% su heterozigoti (genotip CT) a njih 8.7% je homozigot za ređi alel T (genotip TT). Između mladića i devojaka nije uočena statistički značajna razlika u učestalosti genotipova. Učestalost alela C je 69.8%, a alela T 30.2%.

➤ da ne postoji statistički značajna razlika u zavisnosti od KIBRA genotipa u rezultatima postignutim na testovima memorijski sposobnosti i testu opštih kognitivnih sposobnosti: REYcumm, ABimmed TRCmax i RavenPM.

➤ da nema statistički značajne razlike u zavisnosti od KIBRA genotipa u prosečnoj oceni postignutoj tokom srednje škole i prosečnoj oceni na fakultetu

➤ da nema statistički značajne razlike u zavisnosti od KIBRA genotipa u ličnoj proceni o brzini pamćenja i tome koliko puta student ponavljaju gradivo pre izlaska na ispit.

Ispitivanjem APOE rs7412/rs429358 polimorfizma pokazano je:

➤ da je 77.7% studenta homozgoti za alel $\epsilon 3$ (genotip 3/3), 10.1% su heterozigoti genotipa 2/3, 10.4% heterozigoti genotipa 3/4 a svega 0.7% su homozigoti genotipa 4/4. Između mladića i devojaka nije uočena statistički značajna razlika u učestalosti genotipova. Učestalost $\epsilon 3$ alela je 87.9%, $\epsilon 2$ alela 5.6% a $\epsilon 4$ alela 6.5%.

➤ da ne postoji statistički značajna razlika u zavisnosti od prisustva APOE4 alela u rezultatima postignutim na testovima memorijski sposobnosti i testu opštih kognitivnih sposobnosti: REYcumm, ABimmed TRCmax i RavenPM.

➤ da nema statistički značajne razlike u zavisnosti od prisustva APOE4 alela u prosečnoj oceni postignutoj tokom srednje škole i prosečnoj oceni na fakultetu

➤ da nema statistički značajne razlike u zavisnosti od prisustva APOE4 alela u ličnoj proceni o brzini pamćenja i tome koliko puta student ponavljaju gradivo pre izlaska na ispit.

Ispitivanjem BCHE rs1803274 polimorfizma pokazano je:

➤ da je 66.8% studenata homozigot za alel G (genotip GG), 29.3% su heterozigoti (genotip GA) a svega njih 3.9% je homozigot za ređi alel A (genotip AA). Između mladića i devojaka nije uočena statistički značajna razlika u učestalosti genotipova. Učestalost alela G je 81.5%, a alela A 18.5%.

➤ da postoji statistički značajna razlika u rezultatima postignutim na TRCmax testu u zavisnosti od prisustva A alela ($p=0.041$). Nosioci K varijante (A alela)

postizu statistički značajno bolje rezultate na TRCmax testu u odnosu na studente GG genotipa.

➤ da ne postoji statistički značajna razlika u zavisnosti od BCHE genotipa u rezultatima postignutim na drugim testovima memorijski sposobnosti i testu opštih kognitivnih sposobnosti: REYcum, ABimmed i RavenPM.

➤ da nema statistički značajne razlike u zavisnosti od BCHE genotipa u prosečnoj oceni postignutoj tokom srednje škole i prosečnoj oceni na fakultetu

➤ da nema statistički značajne razlike u zavisnosti od BCHE genotipa u ličnoj proceni o brzini pamćenja i tome koliko puta student ponavljaju gradivo pre izlaska na ispit.

LITERATURA

1. Pavlović D. Demencije, neurološki i psihološki vodič. Kaligraf. 2008.
2. Bradly A. Ljudsko pamćenje teorija i praksa. Zavod za udžbenike i nastavna sredstva. Beograd. 2004.
3. Rose S. The making of memory: From molecules to mind. 2003.
4. Očić G: Klinička neuropsihologija, Zavod za udžbenike i nastavna sredstva, Beograd, 1998
5. Pastuović N.: Edukologija, Znamen, Zagreb, 1999
6. Diklić V.: Primena magnetno-rezonantne spektroskopije in vivo u izučavanju poremećaja memorije, Acta Facultatis Medice Naissensis, Edukativni članak 16 (3), str. 180-185, 1999.
7. Trebješanin B.: Udžbenik i savremene koncepcije obrazovanja, Sabor psihologa Srbije, Simpozijum "Psihologija u vaspitanju i obrazovanju", Subotica, 2001.
8. Đorđević J.: Enigma frontalnih režnjeva - klinički neuropsihološki pristup, CIBIF, Beograd, 1997.
9. Japundza-Milisavljevic, M. Oblici ispoljavanja kognitivnih smetnji u obrazovnom procesu dece s lakom mentalnom retardacijom. Doktorska disertacija, Beograd: Univerzitet u Beogradu, Fakultet za specijalnu edukaciju i rehabilitaciju. 2007.
10. Rowe JB, Toni I, Josephs O, Frackowiak RS, Passingham RE. The prefrontal cortex: response selection or maintenance within working memory? Science 2000;288:1656-60.
11. Fletcher PC, Henson RN. Frontal lobes and human memory: insights from functional neuroimaging. Brain. 2001;124:849-881.
12. Newman SD, Carpenter PA, Varma S, Just MA. Frontal and parietal participation in problem solving in the Tower of London: fMRI and computational modeling of planning and high-level perception. Neuropsychologia 2003;41:1668-82

13. Jaeggi SM, Seewer R, Nirkko AC, et al. Does excessive memory load attenuate activation in the prefrontal cortex? Load-dependent processing in single and dual tasks: functional magnetic resonance imaging study. *Neuroimage* 2003;19:210-25.
14. James, W: Principles of psychology, New York, Holt, 1980.
15. Judaš M., Kostović I.: Temelji neuroznanosti, Medicinska naklada Zagreb, Zagreb, 1998.
16. Krstić N., Gojković M.: Uvod u neuropsihološku dijagnostiku, Savez društva
17. Krstić N.: *Osnove razvojne neuropsihologije*, Institut za mentalno zdravlje, Beograd, 1999.
18. Tulving, E. (1972). Episodic and semantic memory. In E. Tulving, & W. Donaldson (Eds.), *Organization of memory*. New York: Academic Press.
19. Budson AE, Price BH. Memory: clinica disorders. In: *Encyclopedia of life sciences*. Vol.11. London: Nature publishing group. 2002:529-536.
20. Fletcher PC, Henson RN. Frontal lobes and human memory: insights from functional neuroimaging. *Brain*. 2001;124:849-881.
21. Simons JS, Spiers HJ. Prefrontal and medial temporal lobe interactions in long-term memory. *Nat Rev Neurosci*. 2003;4:637-648.
22. Wagner AD, Schacter DL, Rotte M et al. Building memories: remembering and forgetting of verbal experience will be remembered. *Science*.1998;281:1185-1187.
23. Petrides M. The mid-ventrolateral prefrontal cortex and active mnemonic retrieval. *Neurobiol Learn Mem*. 2002;78:528-538.
24. Kopelman MD, Stanhope N, Kingsley D. Temporal and spatial context memory in patients with focal frontal, temporal lobe, and diencephalic lesions. *Neuropsychologia*.1997;35:1533-1545.
25. Balota DA, Watson JM, Duchek JM, Ferraro FR. Cross-modal semantic and homographic priming in healthy young, healthy old, and in Alzheimer's disease individuals. *J Int Neuropsychol Soc* 1999;5:626-40.

26. Green JD, Hodges JR. Identification of famous faces and famous names in early Alzheimer's disease: relationship to anterograde episodic and general semantic memory. *Brain* 1996;119:111-28.
27. Daselaar SM, Rombouts SA, Veltman DJ, Raaijmakers JG, Jonker C. Similar network activated by young and old adults during the acquisition of a motor sequence. *Neurobiol Aging* 2003;24:1013-9.
28. Exner C, Koschack J, Irl E. The differential role of premotor frontal cortex and basal ganglia in motor sequence learning: evidence from focal basal ganglia lesions. *Learn Mem* 2002;9:376-86.
29. Population Division of the Department of Economic and Social Affairs of the United Nations Secretariat, *World Population Prospects: The 2010 Revision*, <http://esa.un.org/unpd/wpp/index.htm>; 1:45-68.
30. Dvedzic M, Stoilkovic J. Novo poimanje starosti-prospektivna starost. *Stanovništvo*. 2012.
31. Brickman AM, Stern Y. Aging and Memory in Humans. *Encyclopedia of Neuroscience*. 2009;1:175-180.
32. Herlitz A, Nilsson LG, Backman L. Gender differences in episodic memory. *Mem Cogn*. 1997;25:801-811.
33. Nilsson LG, Nyberg L, Backman L. Genetic variation in memory functioning. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 2002;26:841-848.
34. Backman L, Nilsson LG. Semantic memory functioning across the adult life span. *Eur Psychol* 1996;1:27-33.
35. Christensen H, Korten A, Jorm AF, Henderson AS, Scott R, Mackinnon AJ. Activity levels and cognitive functioning in an elderly community sample. *Age Ageing*. 1996;25:72-80.
36. Chun MM, Turk-Browne NB. Interactions between attention and memory. *Current Opinion in Neurobiology*. 2007;17:177-184.

37. Jiang Y, Chun MM. Selective attention modulates implicit learning. *Q J Exp Psychol A*. 2001;54A:1105-1124.
38. Radonjić S. Psihologija II. Centar za primenjenu psihologiju Društva psihologa Srbije. 1992. Beograd
39. LaBar KS, Cabeza R. Cognitive neuroscience of emotional memory. *Nature reviews Neuroscience*. 2006;7:54-64.
40. Bouchard TJ. Et al. Genetic and environmental influences on special mental abilities in a sample of twins reared apart. *Acta Genet Med Gemellol (Roma)*.1990;39:193-206.
41. Papassotiropoulos A, quervain D. Genetics of human episodic memory: dealing with complexity. *Trends in cognitive sciences*. 2011;15:381-387.
42. Turnpenny P, Ellard S. Emery's elements of medical genetics. 13th eds. Churchill Livingstone Elsevier; 2007.
43. Novaković I, Maksimović N, Cvetković S, Cvetković D. Gene polymorphisms as markers of disease susceptibility. *J Med Biochem*. 2010;29:135 –138.
44. Griffiths A, Miller J, Suzuki D, Lewontin R, Gelbart W. An introduction to genetic analysis. 7theds. New York: W. H. Freeman and company. 2000.
45. Kidd KK. Normal DNA sequence variations in humans. Introductory Review. Yale University New Haven, USA.
46. Mitchell-Ods T, Willis JH, Goldstein DB. Which evolutionary processes influence natural genetic variation for phenotypic traits? *Nature Reviews. Genetics*.2007; 8:845-
47. Papassotiropoulos A. et al. Genetics, transcriptomics, and proteomics of Alzheimer's disease. *J. Clin. Psychiatry*. 2006;67:652-670.
48. Dudai Y. Molecular bases of long-term memories: a question of persistence. *Curr Opin.Neurobiol*. 2002;12:211-216.
49. Kendel ER. The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. *Science*.2001; 294:1030-1038.

- 50 Shobe J. the role of PKA, CaMKII, and PKC in avoidance conditioning: permissive or instructive? *Neurobiol. Learn. Mem.* 2002;77:291-312.
51. Tonegawa S. et al. Genetic neuroscience of mammalian learning and memory. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B: Biol. Sci.* 2003;358:787-795.
52. Waddell S, Quinn WG. What can we teach *Drosophila*? What we can teach us? *Trends genet.* 2001;17:719-726
53. Dempster EL. Et al. Episodic memory performance predicted by the 2bp deletion in exon 6 of the alpha 7-like nicotinic receptor subunit gene. *Am J Psychiatry* 2006;163:1832-1834.
54. Papassotiropoulos A et al. Common KIBRA alleles are associated with human memory performance. *Science.* 2006;314:475-478.
55. Huentelman MJ, et al. Calmodulin-binding transcription activator 1 (CAMTA1) alleles predispose human episodic memory performance. *Hum. Mol. Genet.* 2007;16:1469-1477.
56. Need AC et al. A genome-wide study of common SNPs and CNVs in cognitive performance in the CANTAB. *Hum. Mol. Gent.* 2009;18:4650-4661.
57. Hairiri AR et al. Brain-derived neurotrophic factor val66met polymorphism affects human memory-related hippocampal activity and predicts memory performance. *J. Neurosci.* 2003;23:6690-6694.
58. Welsh MC, Pennington BF, Ozonoff S, Rouse B, McCabe Er. Neuropsychology of early- treated phenylketonuria: specific executive function deficits. *Child Dev.* 1990;61:1697-1713.
59. Bik-Multanowski M, Pietrzyk JJ, Mozrzyk R. Routine use of CANTAB system for detection of neuropsychological deficits in patients with PKU. *Mol. Genet. Metab.* 2011;102:210-213.
60. Topakas E, Kyriakopoulos S, Biely P, Hirsch J, Vafiadi C, Christakopoulos P. Carbohydrate esterases of family 2 are 6-O-deacetylases. *FEBS Lett.* 2010;584:543-548.

61. Cornish Km, Kogan CS, Li L, Turk J, Jacquemont S, Hagerman RJ. Lifespan changes in working memory in fragile X premutation males. *Brain Cogn.* 2009;69:551-558
62. Vered Y, Spivak B, Nechmad A, Schlapnikov N, Graff E, Feinberg I, et al. Plasma serotonin response to carbohydrate rich proof in chronic schizophrenic patients: clozapine versus classic antipsychotic agents. *Hum Psychopharmacol.* 2001;16:403-407.
63. Aid T, Kazantseva A, Piirsoo M, Palm K, Timmusk T. Mouse and rat BDNF gene structure and expression revisited. *J Neurosci Res.* 2007;85(3):525-35.
64. Baj G, Tongiorgi E. BDNF splice variants from the second promoter cluster support cell survival of differentiated neuroblastoma upon cytotoxic stress. *Journal of cell science.* 2009;122:36-43.
65. Hong EJ, McCord AE, Greenberg ME. A biological function for the neuronal activity-dependent component of Bdnf transcription in the development of cortical inhibition. *Neuron.*2008;60(4):610-624.
66. Timmusk T, Palm K, Metsis M, Reintam T, Paalme V, Saarma M, Persson H. Multiple promoters direct tissue-specific expression of the rat BDNF gene. *Neuron.*1993;10(3):475-89.
67. An JJ, Gharami K, Liao GY, Woo NH, Lau AG, Vanevski F, Torre ER, Jones KR, Feng Y, Lu B, Xu B. Distinct role of long 3' UTR BDNF mRNA in spine morphology and synaptic plasticity in hippocampal neurons. *Cell.*2008;134(1):175-87.
68. Carlino D. BDNF as a biomarker in psychiatry. PhD thesis. University of Trieste. 2010.
69. Chen ZY, Patel PD, Sant G, Meng CX, Teng KK, Hempstead BL, Lee FS. Variant brain-derived neurotrophic factor (BDNF) (Met66) alters the intracellular trafficking and activity-dependent secretion of wild-type BDNF in neurosecretory cells and cortical neurons. *J Neurosci.*2004;24(18):4401-4411.

70. Szeszko PR, Lipsky R, Mentschel C, Robinson D, Gunduz-Bruce H, Sevy S, Ashtari M, Napolitano B, Bilder RM, Kane JM, Goldman D, Malhotra AK. Brain-derived neurotrophic factor val66met polymorphism and volume of the hippocampal formation. *Mol Psychiatry*. 2005;10(7):631-6.
71. Lu Y, Christian K, Lu B. BDNF: A Key Regulator for Protein-synthesis Dependent LTP and Long-term Memory? *Neurobiol Learn Mem*. 2008 ; 89(3): 312–323.
72. Pang PT, Lu B. Regulation of late-phase LTP and long-term memory in normal and aging hippocampus: role of secreted proteins tPA and BDNF. *Ageing Research Reviews*. 2004;3: 407–430.2005
73. Woo NH, Teng HK, Siao CJ, Chiaruttini C, Pang PT, Milner TA, Hempstead BL, Lu B. Activation of p75NTR by proBDNF facilitates hippocampal long-term depression. *Nat Neurosci*. 2005;8(8):1069-1077.
74. Pezawas L, Verchinski BA, Mattay VS, Callicott JH, Kolachana BS, Straub RE, Egan MF, Meyer-Lindenberg A, Weinberger DR. The brain-derived neurotrophic factor val66met polymorphism and variation in human cortical morphology. *J Neurosci*. 2004;24(45):10099-102.
75. Watanabe Y, Nunokawa A, Someya T. Association of the BDNF C270T polymorphism with schizophrenia: updated meta-analysis. *Psychiatry Clin Neurosci*. 2013;67(2):123-5.
76. Huang R, Huang J, Cathcart H, Smith S, Poduslo SE. Genetic variants in brain-derived neurotrophic factor associated with Alzheimer's disease. *J Med Genet*. 2007;44(2):e66.
77. Schumacher J, Jamra RA, Becker T, Ohlraun S, Klopp N, Binder EB, Schulze TG, Deschner M, Schmääl C, Höfels S, Zobel A, Illig T, Propping P, Holsboer F, Rietschel M, Nöthen MM, Cichon S. Evidence for a relationship between genetic variants at the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) locus and major depression. *Biol Psychiatry*. 2005;58(4):307-14.

78. Nakajo Y, Miyamoto S, Nakano Y, Xue JH, Hori T, Yanamoto H. Genetic increase in brain-derived neurotrophic factor levels enhances learning and memory. *Brain Res.* 2008;1241:103-9.
79. R. Katoh-Semba, I.K. Takeuchi, R. Semba, K. Kato, Distribution of brain-derived neurotrophic factor in rats and its changes with development in the brain, *J. Neurochem.* 1997; 69:34–42.
80. Bath K, Lee F. Variant BDNF (Val66Met) impact on brain structure and function. *Cognitive, Affective and Behavioral Neuroscience.* 2006;6(1):79-85.
81. Lee R, Kermani P, Teng KK, Hempstead BL. Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Science* 2001;294:1945-1948.
82. Mowla SJ, Pareek S, Farhadi HF, Petrecca K, Fawcett JP, Seidah NG, Morris SJ, Sossin WS, Murphy RA. Differential sorting of nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor in hippocampal neurons. *J. Neurosci.* 1999;19:2069–2080.
83. Binder DK, Croll SD, Gall CM, Scharfman HE. BDNF and epilepsy: too much of a good thing? *Trends Neurosci.* 2001;24(1):47-53.
84. Levine ES, Crozier RA, Black IB, Plummer MR. Brain-derived neurotrophic factor modulates hippocampal synaptic transmission by increasing *N*-methyl-d-aspartic acid receptor activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1998;95:10235–10239.
85. Holsinger RM, Schnarr J, Henry P, Castelo VT, Fahnstock M. Quantitation of BDNF mRNA in human parietal cortex by competitive reverse transcription-polymerase chain reaction: decreased levels in Alzheimer's disease. *Brain Res Mol Brain Res.* 2000;76(2):347-54.
86. Howells DW, Porritt MJ, Wong JY, Batchelor PE, Kalnins R, Hughes AJ, Donnan GA. Reduced BDNF mRNA expression in the Parkinson's disease substantia nigra. *Exp Neurol.* 2000;166(1):127-135.
87. Hartmann M, Heumann R, Lessmann V. Synaptic secretion of BDNF after high-frequency stimulation of glutamatergic synapses. *EMBO J.* 2001;20:5887–5897.

88. Drake CT, Milner TA, Patterson SL. Ultrastructural localization of full-length trkB immunoreactivity in rat hippocampus suggests multiple roles in modulating activity-dependent synaptic plasticity. *J Neurosci* 1999;19:8009–8026.
89. Lou H, Kim SK, Zaitsev E, Snell CR, Lu B, Loh YP. Sorting and activity-dependent secretion of BDNF require interaction of a specific motif with the sorting receptor carboxypeptidase e. *Neuron*.2005; 20;45(2):245-55.
90. Chen ZY, Ieraci A, Teng H, Dall H, Meng CX, Herrera DG, Nykjaer A, Hempstead BL, Lee FS. Sortilin controls intracellular sorting of brain-derived neurotrophic factor to the regulated secretory pathway. *J Neurosci*.2005;25(26):6156-166.
91. Malenka RC, Bear MF. LTP and LTD: an embarrassment of riches. *Neuron* 2004;44:5–21.
92. Abraham WC. How long will long-term potentiation last? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2003;358:735–744.
93. Kelleher RJ 3rd, Govindarajan A, Tonegawa S. Translational regulatory mechanisms in persistent forms of synaptic plasticity. *Neuron* 2004;44:59–73.
94. Gartner A, Staiger V. Neurotrophin secretion from hippocampal neurons evoked by long-term-potentiation-inducing electrical stimulation patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:6386–6391.
95. Schrott GM, Nigh EA, Chen WG, Hu L, Greenberg ME. BDNF regulates the translation of a select group of mRNAs by a mammalian target of rapamycin-phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway during neuronal development. *J Neurosci*. 2004;24(33):7366-7377.
96. Tongiorgi E, Righi M, Cattaneo A. Activity-dependent dendritic targeting of BDNF and TrkB mRNAs in hippocampal neurons. *J Neurosci* 1997;17:9492–9505.
97. Tong L, Balazs R, Thornton PL, Cotman CW. Beta-amyloid peptide at sublethal concentrations downregulates brain-derived neurotrophic factor functions in cultured cortical neurons. *J Neurosci*. 2004 Jul 28;24(30):6799-809.

98. Nagappan G, Zaitsev E, Senatorov VV Jr, Yang J, Hempstead BL, Lu B. Control of extracellular cleavage of ProBDNF by high frequency neuronal activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(4):1267-72.
99. Kremerskothen J, Plaas C, Büther K, Finger I, Veltel S, Matanis T, Liedtke T, Barnekow A. Characterization of KIBRA, a novel WW domain-containing protein. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003; 300(4):862-867.
100. Rodríguez-Rodríguez E, Infante J, Llorca J, Mateo I, Sánchez-Quintana C, García-Gorostiaga I, Sánchez-Juan P, Berciano J, Combarros O. Age-dependent association of KIBRA genetic variation and Alzheimer's disease risk. *Neurobiol Aging*. 2009;30(2):322-324.
101. Johannsen S, Duning K, Pavenstädt H, Kremerskothen J, Boeckers TM. Temporal-spatial expression and novel biochemical properties of the memory-related protein KIBRA. *Neuroscience*. 2008; 155(4):1165-1173.
102. Toker A. Signaling through protein kinases C. *Front Biosci*. 1998;3:1134-1147.
103. Moscat J, Diaz-Meco MT. The atypical protein kinase Cs. *EMBO Rep*. 2000;1:399-403.
104. Hirai T, Chida K. Protein kinase C zeta: activation mechanisms and cellular functions. *J Biochem*. 2003;1-7.
105. Büther K, Plaas C, Barnekow A, Kremerskothen J. KIBRA is a novel substrate for protein kinase Czeta. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004; 317(3):703-707.
106. Sacktor TC, Osten P, Valsamis H, Jiang X, Naik M, Sublette E. Persistent activation of the zeta isoform of protein kinase C in the maintenance of long term potentiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:8342-8346.
107. Drier DA, Tello MK, Cowan M, Wu P, Blace N, Sacktor TC, Yin JCP. Memory enhancement and formation by atypical PKM activity in *Drosophila melanogaster*. *Nat Neurosci*. 2002;5:316-324.

108. Kremerskothen, J., Plaas, C., Kindler, S., Frotscher, M., and Barnekow, A. Postsynaptic recruitment of dendrin depends on both dendritic mRNA transport and synaptic anchoring. *J. Neurochem.* 2006;96: 1659–1666.
109. Duning, K., Schurek, E. M., Schluter, M., Bayer, M., Reinhardt, H. C., Schwab, A., Schaefer, L., Benzing, T., Schermer, B., Saleem, M. A., Huber, T. B., Bachmann, S., Kremerskothen, J., Weide, T., and Pavenstadt, H. KIBRA modulates directional migration of podocytes. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2008;19:1891–1903.
110. Asanuma, K., Kim, K., Oh, J., Giardino, L., Chabanis, S., Faul, C., Reiser, J., and Mundel, P. Synaptopodin regulates the actin-bundling activity of alpha-actinin in an isoform-specific manner. *J. Clin. Invest.* 2005;115:1188–1198.
111. Deller, T., Korte, M., Chabanis, S., Drakew, A., Schwegler, H., Stefani, G. G., Zuniga, A., Schwarz, K., Bonhoeffer, T., Zeller, R., Frotscher, M., and Mundel, P. Synaptopodin-deficient mice lack a spine apparatus and show deficits in synaptic plasticity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2003;100:10494–10499.
112. Boeckers TM. The postsynaptic density. *Cell Tissue Res.* 2006; 326:409-422.
113. Lauriat, T. L., Dracheva, S., Kremerskothen, J., Duning, K., Haroutunian, V., Buxbaum, J. D., Hyde, T. M., Kleinman, J. E., and McInnes, L. A. Characterization of KIAA0513, a novel signaling molecule that interacts with modulators of neuroplasticity, apoptosis, and the cytoskeleton. *Brain Res.* 2006;1121:1–11.
114. Schneider A, Huentelman MJ, Kremerskothen J, Duning K, Spoelgen R, Nikolich K. KIBRA: A New Gateway to Learning and Memory? *Front Aging Neurosci.* 2010;2:4.
115. Makuch L, Volk L, Anggono V, Johnson RC, Yu Y, Duning K, Kremerskothen J, Xia J, Takamiya K, Huganir RL. Regulation of AMPA receptor function by the human memory-associated gene KIBRA. *Neuron.* 2011; 71(6):1022-9.
116. Shin, K., Straight, S., and Margolis, B. PATJ regulates tight junction formation and polarity in mammalian epithelial cells. *J. Cell Biol.* 2005;168:705–711.

117. Shin, K., Wang, Q., and Margolis, B. PATJ regulates directional migration of mammalian epithelial cells. *EMBO Rep.* 2007;8:158–164.
118. Traer, C. J., Rutherford, A. C., Palmer, K. J., Wassmer, T., Oakley, J., Attar, N., Carlton, J. G., Kremerskothen, J., Stephens, D. J., and Cullen, P. J. SNX4 coordinates endosomal sorting of TfnR with dynein-mediated transport into the endocytic recycling compartment. *Nat. Cell Biol.* 2007;9:1370–1380.
119. Rayala, S. K., den Hollander, P., Manavathi, B., Talukder, A. H., Song, C., Peng, S., Barnekow, A., Kremerskothen, J., and Kumar, R. Essential role of KIBRA in co-activator function of dynein light chain 1 in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 2006;281:19092–19099.
120. Hilton, H. N., Stanford, P. M., Harris, J., Oakes, S. R., Kaplan, W., Daly, R. J., and Ormandy, C. J. KIBRA interacts with discoidin domain receptor 1 to modulate collagen-induced signalling. *Biochim. Biophys. Acta* 2008;1783:383–393.
121. Corneveaux JJ, Liang WS, Reiman EM, et al. Evidence for an association between KIBRA and late-onset Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 2010; 31(6):901-909.
122. Das HK, McPherson J, Bruns GAP, Karathanasis SK, Breslow JL. Isolation, characterization, and mapping to chromosome 19 of the human apolipoprotein E gene. *J Biol Chem.* 1985;260:6240-6247.
123. Olaisen B, teisberg P, Gedde-Dahl T Jr. The locus for apolipoprotein E (apoE) is linked to the complement component C3 (C3) locus in chromosome 19 in man. *Hum Genet.* 1982;62:233-236.
124. Paik YK, Chang DJ, Reardon CA, Davies GE, Mahley RW, Taylor JM. Nucleotide sequence and structure of the human apolipoprotein E gene. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1985;82:3445-3449.
125. Blue ML, Williams DL, Zuecker S, Khan SA, Blum CB. Apolipoprotein E synthesis in human kidney, adrenal gland and liver. *Proc Natk. Acad. Sci USA.* 1983;80:283-287.

132. Knijff P, van den Maagdenberg A, Frants R, Havekes L. Genetic heterogeneity of Apolipoprotein E and its influence on plasma lipid and lipoprotein levels. *Human mutation*. 1994;4:178-194.
133. Weisgraber KH, Rall SC, Mahley RW. Human E apoprotein heterogeneity. Cysteine-arginine interchanges in the amino acid sequence of the apoE-isoforms. *J Biol Chem* 256;9077-9083.
134. Rall SC, Weisgraber KH, Mahley RW. Human apolipoprotein E. The complete amino acid sequence. *J Biol Chem*. 1982;257:4171-4178.
137. Pfriefer FW. Cholesterol homeostasis and function in neurons of the central nervous system. *Cell Mol Life Sci*. 2003;60:1158-1171.
138. Goritz C, Mauch DH, Nagler K, Pfriefer FW. Role of glia-derived cholesterol in synaptogenesis: new revelations in the synapse-glia affair. *J. Physiol. Paris*. 2002;96:257-263.
139. Koudinov AR, Berezov TT. Cholesterol, statins, and Alzheimer's disease. *PLoS Med*. 2005;2:E81.
140. Mauch DH, Nagler K, Schumacher S et al. CNS synaptogenesis promoted by glia-derived neurons may outsource the cholesterol delivery function for synaptogenesis to the astrocytes. *Science*. 2001;294:1354-1357.
141. Klopfenstein DR, Tomishige M, Stuurman N, Vale RD. Role of phosphatidylinositol (4,5) biphosphate organization in membrane transport by the Unc104 kinesin motor. *Cell*. 2002; 109:347-358.
142. Chaves EP, Narayanaswami V. Apolipoprotein E and cholesterol in aging and disease in the brain. *Future Lipidol*. 2008;3(5):505-530.
143. Posse De Chaves EI, Vance DE, Campenot RB, Kiss RS, Vance JE. Uptake of lipoproteins for axonal growth of sympathetic neurons. *J Biol Chem*. 2000;275:19883-19890.

144. 19. Pitas RE, Boyles JK, Lee SH, Hui D, Weisgraber KH. Lipoproteins and their receptors in the central nervous system. Characterization of the lipoproteins in cerebrospinal fluid and identification of apolipoprotein B, E(LDL) receptors in the brain. *J Biol Chem.* 1987;262:14352–14360.
145. Bu G. Apolipoprotein E and its receptors in Alzheimer's disease: pathways, pathogenesis and therapy. *Nature Reviews.* 2009;10:333-344.
146. Rebeck GW, Reiter JS, Strickland DK, Hyman BT. Apolipoprotein E in sporadic Alzheimer's disease: allelic variation and receptor interactions. *Neuron.* 1993;11:575-580.
147. Rapp A, Gmeiner B, Huttinger M. Implication of apoE isoforms in cholesterol metabolism by primary rat hippocampal neurons and astrocytes. *Biochimie.* 2006;88:473-483.
148. Liu Q, et al. Amyloid precursor protein regulates brain apolipoprotein E and cholesterol metabolism through lipoprotein receptor LRP1. *Neuron.* 2007;56:66-78.
149. Fryer JD, et al. The low density lipoprotein receptor regulates the level of central nervous system human and murine apolipoprotein E but does not modify amyloid plaque pathology in PDAPP mice. *J. Biol. Chem.* 2005;280:25754-25759.
150. Strittmatter WJ, Hill CB. Molecular biology of apolipoprotein E. *Current opinion in lipidology.* 2002;13:119-123.
151. Grootendorst J, Bour A, Vogel E, Kelche C, Sullivan PM, Dodart JC. Human apoE targeted replacement mouse lines: h-apoE4 and h-apoE3 mice differ on spatial memory performance and avoidance behavior. *Behavioural and brain research.* 2005;159(1):1-14.
152. Qiu S, Korwek KM, Weeber EJ. A fresh look at an ancient receptor family: Emerging roles for low density lipoprotein receptors in synaptic plasticity and memory formation. *Neurobiology of learning and memory.* 2006; 85:16-29.
153. Hoe HS, Harris DC, Rebeck GW. Multiple pathways of apolipoprotein E signaling in primary neurons. *J. Neurochem.* 2005;93:145-155.

154. Misra UK, Adlakha CL, Gawdi G, McMillian MK, Pizzo SV, Laskowitz DT. Apolipoprotein E and mimetic peptide initiate a calcium dependent signaling response in macrophages. *Journal of Leukocyte biology*. 2001;70:677-683.
155. Muller W, Meske V, Baerlin K, Schrangl H, Marz W, Ohm TG. Apolipoprotein E isoforms increase intracellular Ca^{2+} differentially through a omega-agatoxin IVa-sensitive Ca^{2+} channel. *Brain pathology*. 1998;8:641-653.
156. Lee Y, Aono M, Laskowitz D, Warner DS, Pearlstein RD. Apolipoprotein E protects against oxidative stress in mixed neuronal-glia cell cultures by reducing glutamate toxicity. *Neurochemistry International*. 2004;44:107-118.
157. Gutman CR, Strittmater WJ, Weisgraber KH, Matthew WD. Apolipoprotein E binds to and potentiates the biological activity of ciliary neurotrophic factor. *Journal of Neuroscience*. 1997;17:6114-6121.
158. Curtiss LK, Boisvert WA. Apolipoprotein E and atherosclerosis. *Current opinions in lipidology*. 200;11:243-251.
159. Gee JR, Keller GN. Astrocytes: regulation of brain homeostasis via apolipoprotein E. *Int J Biochem Cell Biol*. 2005;37:1145-1150.
160. Masterman T, Hillert J. The telltale scan: APOE4 in multiple sclerosis. *Lancet Neurol*. 2004;3:331.
161. Kounnas MZ et al. LDL receptor-related protein, a multifunctional APOE receptor, binds secreted β -amyloid precursor protein and mediates its degradation. *Cell*. 1995;331-340.
162. Ye S, et al. Apolipoprotein (apo) E4 enhances amyloid β peptide production in cultured neuronal cells: apoE structure as potential therapeutic target. 2005; *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005;102:18700-18705.
163. LaDu MJ et al. Isoform-specific binding of apolipoprotein E to β -amyloid. *J Biol Chem*. 1994;269:23403-23406.
164. Schmechel DE et al. Increased amyloid β -peptide deposition in cerebral cortex as a consequence of apolipoprotein E genotype in late-onset Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993;90:9649-9653.

165. Bogdanovic N, Corder E, Lannfelt L, Winblad B. APOE polymorphism and clinical duration determine regional neuropathology in Swedish APP (670, 671) mutation carriers: implications for late-onset Alzheimer's disease. *J Cell Mol Med.* 2002;6:199-214.
166. Deane R et al. ApoE isoform-specific disruption of amyloid β clearance from mouse brain. *J Clin. Invest.* 2008; 118:4002-4013.
167. Billings LM, Oddo S, Green KN, McGaugh JL Early Alzheimer's disease-related cognitive deficits in transgenic mice. *Neuron.* 2005;45:675-688.
168. Ledesma MD et al. Raft disorganization leads to reduced plasmin activity in Alzheimer's disease brains. *EMBO Rep.* 2003;4:1190-1196.
169. Hamanaka H et al. Altered cholesterol metabolism in human apolipoprotein E4 knock-in mice. *Hum Mol Genet.* 2000;9:353-361.
170. Holtzman DM et al. Low density lipoprotein receptor related protein mediates apolipoprotein E-dependent neurite outgrowth in central nervous system derived neuronal cell line. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1995;92:9480-9484.
171. Hayashi H, Campenot RB, Vance DE, Vance JE. Apolipoprotein E containing lipoproteins protect neurons from apoptosis via a signaling pathway involving low-density lipoprotein receptor-related protein 1. *J. Neurosci.* 2007;27:1933-1941.
172. Allderdice PW et al. The cloned butyrylcholinesterase (BCHE) gene maps to a single chromosome site, 3q26. *Genomics.* 1991;11:452-454.
173. Arpagaus M. et al Structure of the gene for human butyrylcholinesterase. Evidence for a single copy. *Biochemistry.* 1990;9:124-131.
174. Millard CB, Bromfield CA. A computer model of glycosylated human butyrylcholinesterase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1992;189:1280-1286.
175. Darvesh S, Hopkins D, Geula C. Neurobiology of butyrylcholinesterase. *Nature Reviews. Neuroscience.* 2003;4:131-138.
176. Bartels CF, Jensen FS, Lockridge O, van der Spek AF, Rubinstein HM, Lubrano T, La Du N. *Am J Hum Genet.* 1992;50:1086-1103.

177. O'Brien KK, Sawby BK, Ballard CG, Grace J, Harrington F, Ford GA, O'Brien JT, Swan AG, Fairbairn AF, Wesnes K, et al. *Pharmacogenetics*. 2003;13:231-239.
178. Lopez OL, Becker JT, Wisniewski S et al. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*. 2002;72:310-314.
179. Manoharan I, Kuznetsova A, Fisk JD, et al. Comparison of cognitive functions between people with silent and wild-type butyrylcholinesterase. *J Neural Transm*. 2007;114:939-945.
180. Lehmann H, Ryan E. The familial incidence of low pseudocholinesterase level. *Lancet*.1956;2:124.
181. Robertson RT, Mostamand F. Development of non-specific cholinesterase-containing neurons in dorsal thalamus of the rat. *Brain Res Dev Brain Res*.1988;41:43-60.
182. Giacobini E. Cholinesterases and cholinesterase inhibitors. ed Giacobini E. Martin Dunitz Ltd London.2000:181-226.
183. Mesulam MM. et al. Acetylcholinesterase knockouts establish central cholinergic pathways and can use butyrylcholinesterase to hydrolyze acetylcholine. *Neuroscience*. 2002;110:627-639.
184. Katona G, Berglund GI, Hajdu J, Graf L, Szilagyi L. Crystal structure reveals basis for the inhibitor resistance of huam brain trypsin. *J Mol Biol*. 2002;315:1209-1218.
185. Geula C, Mesulam MM. Special properties of cholinesterases in cerebral cortex of Alzheimer's disease. *Brain Res*. 1989;185-189.
186. Arendt T, Bruckner MK, Lange M, Bigl V. Changes in acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in Alzheimer's disease resemble embryonic development- a study of molecular forms. *Neurochem. Int*. 1992;21:381-396.
187. Wright CI, Geula C, Mesulam MM. Neuroglial cholinesterases in the normal brain and in Alzheimer's disease: relationship to plaques, tangles, and patterns of selective vulnerability. *Ann. Neurol*. 1993;34:373-384.

188. Mesulam MM, Geula C. Butyrylcholinesterase reactivity differentiates the amyloid plaques of aging from those of dementia. *Ann Neurol.* 1994;36:722-727.
189. Lehmann DJ, Johnston C, Smith AD. Synergy between the genes for butyrylcholinesterase K variant and apolipoprotein E4 in late-onset confirmed Alzheimer's disease. *Hum. Mol. Genet.* 1997;6:1933-1936.
190. Alvarez-Arcaya A. et al. The butyrylcholinesterase K variant is a protective factor for sporadic Alzheimer's disease in women. *Acta Neurol Scand.* 2000;102:350-353.
191. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 1988;16(3):1215.
192. www.lifetechnologies.com
193. Rey, A. L'examen clinique en psychologie. Paris: Presses Universitaires de France. 1964.
194. Wechsler, D. Wechsler Memory Scale - Revised Edition. Manual. New York: The Psychological Corporation. 1987.
195. Cooper, J. A., Sagar, H. J., Jordan, N., Harvey, N. S., & Sullivan, E. V. Cognitive impairment in early, untreated Parkinson's disease and its relationship to motor disability. *Brain.* 1991;114:2095-2122.
196. Raven, J., Raven, J.C., & Court, J.H. Manual for Raven's Progressive Matrices and Vocabulary Scales. San Antonio, TX: Harcourt Assessment. 2004.
197. Lynna R, Irwing P, Sex differences on the progressive matrices: A meta-analysis. *Intelligence.* 2004;32:481-498.
198. Buha N, Gligorovic M. Povezanost radne memorije i intelektualnog funkcionisanja kod dece sa lakom intelektualnom ometenošću. *Specijalna edukacija i rehabilitacija.* 20012;11(1):21-38.
199. Herlitz A, Nilsson LG, Backman L. Gender differences in episodic memory. *Mem Cogn.* 1997;25:801-811.

200. Poo M. Neurotrophins as synaptic modulators. *Nat Rev Neurosci.* 2001; 2:24-32.
201. Egan MF, Kojima M, Callicott JH, et al. The BDNF val66met polymorphism affects activity-dependent secretion of BDNF and human memory and hippocampal function. *Cell.* 2003; 112:257-269.
202. The allele frequency database. A resource of gene frequency data on human populations supported by the U. S. National Science Foundation. U. S. National Science Foundation.
203. Shimizu E, Hashimoto K, Iyo M. Ethnic difference of the BDNF 196G/A [val66met] polymorphism frequencies: The possibility to explain ethnic mental traits. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2004;126B:122–123.
204. Dempster, E., Toulopoulou, T., McDonald, C., Bramon, E., Walshe, M., Filbey, F., Wickham, H., Sham, P.C., Murray, R.M. and Collier, D.A. Association between BDNF val66met genotype and episodic memory. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2005;134B, 73–75.
205. Goldberg TE, Iudicello J, Russo C, Elvevåg B, Straub R, Egan MF, Weinberger DR. BDNF Val66Met polymorphism significantly affects d' in verbal recognition memory at short and long delays. *Biological Psychology.* 2008;77:20–24.
206. Echeverria, D., Woods, J.S., Heyer, N.J., Rohlman, D.S., Farin, F.M., Bittner, A.C.J., Li, T. and Garabedian, C. Chronic lowlevel mercury exposure, BDNF polymorphism, and associations with cognitive and motor function. *Neurotoxicol Teratol.* 2005;27, 781–796.
207. Miyajima F, Ollier W, Mayes A, Jackson A, Thacker N, Rabbitt P, Pendleton N, Horan M, Payton A. Brain-derived neurotrophic factor polymorphism Val66Met influences cognitive abilities in the elderly. *Genes Brain Behav.* 2008;7:411–417.
208. Miyajima F, Quinn JP, Horan M, Pickles A, Ollier WE, Pendleton N, Payton A. Additive effect of BDNF and REST polymorphisms is associated with improved general cognitive ability. *Genes Brain Behav.* 2008;7:714–719.

209. Tsai S-J, Hong C-J, Yu YWY, Chen T-J. Association study of a Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) Val66Met polymorphism and personality trait and intelligence in healthy young females. *Neuropsychobiology*. 2004;49:13–16.
210. Harris SE, Fox H, Wright AF, Hayward C, Starr JM, Whalley LJ, Deary IJ. The brain-derived neurotrophic factor Val66Met polymorphism is associated with age-related change in reasoning skills. *Mol Psychiatry*. 2006;11:505–513.
211. Hansell NK, James MR, Duffy DL, Birley AJ, Luciano M, Geffen GM, Wright MJ, Montgomery GW, Martin NG. Effect of the BDNF V166M polymorphism on working memory in healthy adolescents. *Genes Brain Behav*. 2007;6:260–268.
212. Nemoto, K., Ohnishi, T., Mori, T., Moriguchi, Y., Hashimoto, R., Asada, T., et al.. The Val66Met polymorphism of the brain-derived neurotrophic factor gene affects age-related brain morphology. *Neuroscience Letters*. 2006;397, 25–29.
213. Bueller JA, Aftab M, Sen S, Gomez-Hassan D, Burmeister M, Zubieta JK. BDNF Val(66)Met Allele Is Associated with Reduced Hippocampal Volume in Healthy Subjects. *Biol Psychiatry* 2006;59:812–815.
214. Dennis NA, Cabeza R, Need AC, Waters-Metenier S, Goldstein DB, LaBar KS. Brain-derived neurotrophic factor val66met polymorphism and hippocampal activation during episodic encoding and retrieval tasks. *Hippocampus*. 2011;21(9):980-9.
215. Schneider A, Huentelman MJ, Kremerskothen J, et al. KIBRA: a new getaway to learning and memory? *Frontiers in aging neuroscience*. 2010; 2:41-49.
216. Johannsen S, Duning K, Pavenstadt H, et al. Temporal-spatial expression and novel biochemical properties of the memory-related protein KIBRA. *Neuroscience*. 2008; 155:1165-1173.
217. Buther K, Plaas C, Barnekow A, and Kremerskothen J. KIBRA is a novel substrate for protein kinase C ζ . *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2004; 317:703-707.
218. Schaper K, Kolsch H, Popp J et al. KIBRA gene variants are associated with episodic memory in healthy elderly. *Neurobiol Aging*. 2008;29:1123-1125.

219. Almeida OP, Schwab SG, Lautenschlager NT, Morar B, Greenop KR, Flicker L, Wildenauer D. KIBRA genetic polymorphism influences episodic memory in later life, but does not increase the risk of mild cognitive impairment. *J Cell Mol Med*. 2008.
220. Preuschof C, Heekeren HR, Li SC et al. KIBRA and CLSTN2 polymorphisms exert interactive effects on human episodic memory. *Neuropsychologia*. 2010;48:402-408.
221. Vassos E, Bramon E, Picchioni M et al. Evidence of association of KIBRA genotype with episodic memory in families with psychotic patients and controls. *J Psychiatr Res*. 2010;44:795-798.
222. Nacmias B, Bessi V, Bagnoli S, Tedde A, Cellini E, Piccini C, Sorbi S, Bracco L. KIBRA gene variants are associated with episodic memory performance in subjective memory complaints. *Neurosci Lett*. 2008; 436:145–147.
223. Need AC, Attix DK, McEvoy JM, Cirulli ET, Linney KN, Wagoner AP, Gumbs CE, Giegling I, Möller HJ, Francks C, Muglia P, Roses A, Gibson G, Weale ME, Rujescu D, Goldstein DB. Failure to replicate effect of kibra on human memory in two large cohorts of European origin. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2009;147: 667–668.
224. Bates TC, Price JF, Hariss SE et al. Association of KIBRA and memory. *Neurosci Lett*. 2009;458:140-143.
225. Milnik A, Heck A, Vogler C, Heinze HJ, de Quervain DJ, Papassotiropoulos A. Association of KIBRA with episodic and working memory: a meta-analysis. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2012;159B(8):958-69.
226. Burgess Jd, Pedraza O, Graff-Radford NR et al. Association of common KIBRA variants with episodic memory and AD risk. *Neurobiol Aging*.
227. Boyles JK, Pitas RE, Wilson E et al. Apolipoprotein E associated with astrocytic glia of the central nervous system and with non-myelinating glia of the peripheral nervous system. *J Clin Invest*. 1985; 76:1501-1513.

228. Stanković S, Glišić S, Alavantić D. The effect of a gender difference in apolipoprotein E gene DNA polymorphism on serum lipid levels in Serbian healthy population. *Clin Chem Lab Med*. 2000;38:539-544.
229. Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel D, et al. Association of apolipoprotein E allele ϵ 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease. *Neurology*. 1993; 43:1467-1472.
230. Tuminello ER, Han SD. The apolipoprotein E antagonistic pleiotropy hypothesis: review and recommendations. *International Journal of Alzheimer's disease*. 2011.
231. Damjanović T. Ispitivanje polimorfizama gena i drugih faktora rizika za razvoj ateroskleroze u populaciji školske dece. Doktorska disertacija. 2009.
232. Mondadori CRA, de Quervain DJ-F, Buchmann A, Mustovic H, Wollmer MA, Schmidt CF, et al. Better memory and neural efficiency in young apolipoprotein E epsilon4 carriers. *Cereb Cortex* 2007;17: 1934–47.
233. Hubacek JA, Pitha J, Skodova Z, Adamkova V, Lanska V, Poledne R. A possible role of apolipoprotein E polymorphism in predisposition to higher education. *Neuropsychobiology* 2001;43:200 –3.
234. Yu YW, Lin CH, Chen SP, Hong CJ, Tsai SJ. Intelligence and event-related potentials for young female human volunteer apolipoprotein E epsilon4 and non-epsilon4 carriers. *Neurosci Lett* 2000; 294:179–81.
235. Han SD, Drake AI, Cessante LM, Jak AJ, Houston WS, Delis DC, et al. APOE and recovery from TBI in a U.S. military population: evidence for a compensatory mechanism? *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2007;78: 1103–8.
236. Han S, Bodi M. Revision of the apolipoprotein E compensatory mechanism recruitment hypothesis. 2008;4(4):251-254.
237. Jorm AF, Mather KA, Butterworth P, Anstey KJ, Christensen H, Eastaer S. APOE genotype and cognitive functioning in a large age-stratified population sample. *Neuropsychology* 2007;21:1–8.

238. Liu F, Pardo L, Schuur M. et al. The apolipoprotein E and its age-specific effects on cognitive function. *Neurobiology of aging*. 2010;31:1831-1833.
239. Bunce D, Anstey K, Burns R et al. Does possession of apolipoprotein E e4 benefit cognitive function in healthy young adults? *Neuropsychologia*. 2011;49:1693-1697.
240. Ihle A, Bunce D, Kliegel M. APOE e4 and cognitive function in early life: a meta-analysis. 2012;26(3):267-277.
241. Teylor AE, Guthrie PA, Smith GD et al. IQ, educational attainment, memory and plasma lipids: Associations with apolipoprotein E genotype in 5995 children. *Biol Psychiatry*. 2011;70(2):152-158.
242. O Dwyer L, Lambertson F, Matura S et al. Reduced hippocampal volume in healthy young apoe4 carriers: an MRI study. *Plos/one* 2012;7(11):e48895.
243. Pedraza O, Bowers D, Gilmore R Asymmetry of the hippocampus and amygdala in MRI volumetric measurements of normal adults. *J Int Neuropsychol Soc*. 2004;10:664–678.
244. Soininen H, Partanen K, Pitkänen A, Hallikainen M, Hanninen T, et al. Decreased hippocampal volume asymmetry on MRIs in nondemented elderly subjects carrying the apolipoprotein E epsilon 4 allele. *Neurology*. 1995;45:391–392.
245. Tohgi H, Takahashi S, Kato E, Homma A, Niina R, et al. Reduced size of right hippocampus in 39- to 80-year-old normal subjects carrying the apolipoprotein E epsilon4 allele. *Neurosci Lett*. 1997;236:21–24.
246. Dennis N, Browndyke J, Stokes J et al. Temporal lobe functional activity and connectivity in young adult APOE e4 carriers. *Alzheimers demet* 2010;6(4):303-311.
247. Reiman EM, Chen K, Alexander GE, Caselli RJ, Bandy D, et al. Functional brain abnormalities in young adults at genetic risk for late-onset Alzheimer's dementia. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004;101:284-289.
248. Mesulam, M.-M. Neuroanatomy of cholinesterases in the normal human brain and in Alzheimer's disease. In: *Cholinesterases and Cholinesterase Inhibitors* (E. Giacobini, Ed.), 2000;121–138. Martin Dunitz, London.

249. Bartels CF, Jensen FS, Lockridge O, et al. DNA mutation associated with the human butyrylcholinesterase K-variant and its linkage to the atypical variant mutation and other polymorphic sites. *Am J Hum Genet.* 1992; 50:1086-1103.
250. Perry EK, Perry RH, Blessed G, et al. Changes in brain cholinesterases in senile dementia of Alzheimer type. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 1978; 4:273-277.
251. Podoly E, Shalev D, Shenhar-Tsarfaty S, et al. The butyrylcholinesterase K variant confers structurally-derived risks for Alzheimer's pathology. *Journal of biological chemistry.* 2009; 284(25):17170-17179.
252. Ghebremedin E, Thal DR, Schultz C, et al. Homozygosity for the K variant of BCHE gene increases the risk for development of neurofibrillary pathology but not amyloid deposits at young ages. *Acta Neuropathologica.* 2007; 114(4):359-363.
253. Greig NH, Utsuki T, Ingram DK. Selective butyrylcholinesterase inhibition elevates brain acetylcholine, augments learning and lowers Alzheimer β -amyloid peptide in rodent. *PNAS.* 2005;102(47):17213-17218.
254. Manoharan, I., Wieseler, S., Layer, P.G., Lockridge, O. and Boopathy, R. Naturally occurring mutation Leu307Pro of human butyrylcholinesterase in the Vysya community of India. *Pharmacogenetics and Genomics.* 2006;16:461-468.

SPISAK SKRAĆENICA

- AB – Alchajmerova bolest
- A β – amyloid beta
- ACh – acetilholin
- AChE – acetilholin esteraza
- APOE – apolipoprotein E
- APP – amiloidni prekursori protein
- BChE – butirilholin esteraza
- BDNF (brain derived neurotrphic factor) – moždani faktor rasta
- CAVLT (Californian auditory verbal learning test) – Kalifornijski test auditorno verbalnog učenja
- COMT – katehol O-metil transferaza
- GWAS – (genome wide association study) - studija asocijacije celokupnog genoma
- KIBRA – kidney brain protein
- LDLR – receptor za lipoprotein male gustine
- LDP – dugotrajna depresija
- LTP – dugotrajna potencijacija
- MTL – medijalni temporalni lobus
- PAA – poliakrilamid
- PCR-RFLPs metoda – reakcija lančane polimerizacije – polimorfizam dužine restrikcionih fragmenata
- PKC – protein kinaza C
- PKM ζ – protein kinaza M ζ
- RAVENPM – Ravenove progresivne matrice
- RAVLT – Rey-ov auditivno verbalni test učenja

- SNP – polimorfizam pojedinačnih nukleotida
- TRC – test ređanja cifara
- VNTR – polimorfizam broja uzastopnih ponovaka
- WCHR – Vekslerova revidirana skala pamćenja

BIOGRAFIJA

Nela Maksimović je Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu upisala 1999/00god. Diplomirala molekularnu biologiju i fiziologiju 2005.-e god., smer eksperimentalna biomedicina.

Diplomski rad na temu "Indirektna genska analiza distrofinopatija" radila na Institutu za biologiju i humanu genetiku Medicinskog fakulteta u Beogradu i odbranila sa ocenom 10, 27. 12. 2005.

2006/07 upisala doktorske studije na Medicinskom fakultetu u Beogradu studijska grupa Molekularna medicina.

Od 01.06.2006. angažovana kao istraživač pripravnik za rad na projektu br. 145025 koji finansira Ministarstvo nauke Srbije, čiji je rukovodilac prof. dr Nadežda Čovičković-Šternić.

Od 01.10. 2006. učestvovala u praktičnoj nastavi Katedre za biologiju i humanu genetiku kao volonter.

Od 01. 11.2008. radi kao asistent za užu naučnu oblast Humana genetika na Medicinskom fakultetu u Beogradu.

U okviru poslediplomskog usavršavanja boravila maja 2007.god. u laboratoriji Službe za medicinsku genetiku Kliničkog centra u Ljubljani. Takođe, završila poslediplomski tečaj: Aspekti genetskog savjetovanja održan na Hrvatskom institutu za istraživanje mozga u Zagrebu jula 2007.god.

U periodu od 01.08.2009.god. do 30.01.2010.god bila na stručnom usavršavanju na Institutu za humanu genetiku, Univerzitetska klinika Ependorf, Hamburg, Nemačka.

2011- učestvuje u projektima, „ Analiza genetičkih markera mišićne distonije” (ev. br. 175091, rukovodilac Prof dr Ivana Novaković) i „Ispitivanje molekularno-genetskih, patohistoloških i biohemijskih karakteristika neuromišićnih bolesti” (ev. br. 175083, rukovodilac Prof dr Vidosava Rakočević – Stojanović).

Tečno govori engleski jezik, služi se francuskim i španskim.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а _____ Максимовић Нела

број уписа _____ 06-ДС-ММ-5

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

"Анализа полиморфизама гена за АПОЕ, БДНФ, БЦХЕ и КИБРА и њихова
корелација са меморијским способностима у популацији студената"

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 05.01.2014.

Maximović Nela

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Нела Максимовић

Број уписа 06-ДС-ММ-05

Студијски програм молекуларна медицина

Наслов рада "Анализа полиморфизама гена за АПОЕ, БДНФ, БЦХЕ и КИБРА и њихова корелација са меморијским способностима у популацији студената"

Ментор Проф. др Ивана Новаковић

Потписани Нела Максимовић

изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 05.01.2014.

Nela Maximović

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

"Анализа полиморфизама гена за АПОЕ, БДНФ, БЦХЕ и КИБРА и њихова корелација са меморијским способностима у популацији студената"

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство

2. Ауторство - некомерцијално

3. Ауторство – некомерцијално – без прераде

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима

5. Ауторство – без прераде

6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 05.01.2014.

Анастасија Нелко