

**Univerzita Palackého v Olomouci**

**Bakalářská práce**

**Olomouc 2019**

**Anastasiia Kuznetsova**

**Univerzita Palackého v Olomouci**

**Přírodovědecká fakulta**

**Katedra buněčné biologie a genetiky**



**Cílená lipidomická analýza likvoru u  
pacientů s Alzheimerovou chorobou**

**Bakalářská práce**

**Anastasiia Kuznetsova**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

**Olomouc 2019**

**Vedoucí práce: doc. RNDr. David Friedecký Ph.D.**

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně v průběhu bakalářského studia pod vedením doc. RNDr. Davida Friedeckého Ph.D. s použitím uvedených literárních zdrojů.

V Olomouci dne 15. 5. 2019

.....

Anastasiia Kuznetsova

## SOUHRN

Alzheimerova choroba se řadí k nejběžnějším neurodegenerativním onemocněním. Nesprávně složené proteiny ve své funkční podobě sloužící především ke stabilizaci mikrotubulů, ztrácí kvůli hyperfosforylaci schopnost vázat svůj původní substrát a vytváří polymerní agregáty. Které jsou toxické a spolu s beta amyloidovými plaky vedou k poškození a následnému zániku nervových buněk. Jehož následkem dochází je porušení kognitivních funkcí.

Tato práce se zabývá použitím cíleného lipidomického přístupu v analýze likvoru pacientů s tímto onemocněním. Byla aplikována metoda vysoko účinné kapalinové chromatografie, ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií. Bylo identifikováno celkem 92 lipidů. Pomocí statistických metod byly vyhodnoceny změny v lipidomu u pacientů ve srovnání s kontrolní zdravou skupinou. Byly nalezeny jak dříve publikované, tak nové potenciální biomarkery onemocnění.

## SUMMARY

Alzheimer's disease is one of the most common neurodegenerative diseases. Incorrectly folded proteins in its functional form, serving primarily to stabilize microtubules. They lose due to hyperphosphorylation the ability to bind their original substrate. Then they form polymer aggregates which are toxic and, together with beta amyloid plaques, lead to damage and subsequent nerve cell death. Resulting in cognitive impairment.

This work deals with the use of targeted lipidomic approach in CSF analysis of patients with this disease. A high performance liquid chromatography method was applied in conjunction with tandem mass spectrometry. A total of 92 lipids were identified. Statistical methods were used to evaluate changes in lipidoma in patients compared to a healthy control group. Both previously published and new potential biomarkers of the disease have been found.

**Poděkování:**

Ráda bych poděkovala svému vedoucímu bakalářské práce panu doc. RNDr. Davidu Friedeckému, Ph.D. za odborné vedení, ochotu při konzultacích a především trpělivost. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Radaně Karlíkové, Ph.D. a Mgr. Štěpanovi Kouřilu za pomoc ve vypracování dat, získaných v průběhu experimentu. Dekuji všem pracovníkům a studentům Laboratoře metabolomiky Ústavu molekulární a translační medicíny Lékařské fakulty Univerzity Palackého.

# Obsah

Bakalářská práce .....	0
Olomouc 2019            Vedoucí práce: doc. RNDr. David Friedecký Ph.D.....	0
1. Úvod .....	1
2. Cíle práce .....	2
3. Literární přehled .....	3
3.1 Alzheimerova choroba (AD).....	3
3.1.1 Tau protein – funkční (normální) x hyperfosforylovaný.....	4
3.1.2 Beta amyloid .....	7
3.1.3 Vliv agregátů (plaků) na mozek .....	9
3.2 Genetické příčiny alzheimerovy nemoci (Familiální AD) .....	10
3.2.1 Mutace APP poblíž míst štěpení beta a gama sekretázami .....	10
3.2.2 Mutace v Tau proteinu .....	10
3.2.3 Mutace v presenilinových genech .....	11
3.2.4 Další rizikové geny .....	12
3.3 Negenetické příčiny (Sporadická AD) .....	12
3.3.1 Věk a vlivy prostředí.....	12
3.3.2 Snížení obrany před nesprávně složenými proteiny (Autofagie, ubikvitinový systém...)	13
3.3.3 Poruchy mitochondrií a energetického metabolismu, oxidativní stress .....	14
3.3.4 Vliv zánětu .....	15
3.4 Molekulární biomarkery AD.....	15
3.4.1 Biomarkery AD v klinické praxi.....	16
3.5 Lipidomika.....	17
3.5.1 Lipidomický profil lidského mozkomíšního moku .....	18
3.5.2 Lipidomické odlišnosti u AD .....	21
3.5.3 Cholesterol a jeho deriváty .....	22
3.5.4 Ceramidy a sfingomyeliny .....	24
3.5.5 Mastné kyseliny .....	25
4. Praktická část .....	26
4.1 Hmotnostní spektrometrie jako vhodná metoda.....	26
4.2 Metodika experimentu .....	28
4.2.1 Výběr vzorků .....	28
4.2.2 Příprava vzorků a postup.....	28
4.2.3 Použité přístroje .....	29

4.2.4 Zpracování výsledků a statistická analýza .....	29
4.3 Výsledky .....	30
4.4. Diskuse .....	37
5. Závěr .....	40
Zdroje.....	41



## SEZNAM SYMBOLŮ A ZKRATEK

AD – Alzheimer's disease (Alzheimerova nemoc)

A $\beta$  – amyloid beta

AK – aminokyseliny

APP – amyloidní prekurzorový protein

APOE – apolipoprotein E

ATP – adenosintrifosfát

CE - estery cholesterolu

Cer – ceramidy

CNS – centrální nervový systém

CSF – cerebrospinal fluid (mozkomíšni mok)

DG – diacylglyceroly

DHA – kyselina docosahexaenová

ESI - electrospray ionization (ionizační metoda hmotnostní spektrometrie)

FA, MK – fatty acids (mastné kyseliny)

HDL - high-density lipoprotein

HexCer – hexaglycosylceramidy

Hex2Cer – dihexaglycosylceramidy

LPC - lyso-fosfatidylcholin

LPC-O - lyso-fosfatidylcholin s alkylovými substituenty

LPE – fosfatidylethanolaminy

LPE-O - fosfatidylethanolaminy s alkylovými substituenty

MALDI-MS - matrix-assisted laser desorption ionization (ionizační metoda hmotnostní spektrometrie)

MAP - microtubule-associated protein (protein asociovaný s mikrotubuly)

MAPT - microtubule-associated protein tau (gen pro tau protein)

MRI – magnetická rezonance

MS – multiple sclerosis (roztroušená skleróza)

MTBE - methyl-t-butylether

PC – fosfatidylcholin

PC-O - fosfatidylcholin s alkylovými a alkenylovými substituenty

PET – pozitronová emisní tomografie

PG – fosfatidylglyceroly

PI – fosfatidylinositoly

PS – fosfatidylseriny

PS1 – presenilin 1

PTLP - protein transportující fosfolipidy

ROS – reactive oxygen species (reaktivní kyslíkové radikály)

SM – sfingomyeliny

Tau – Tubulin associated unit (Protein asociovaný s tubuliny)

TG – triacylglyceroly

TOF-SIMS – time-of-flight mass spectrometry

WHO – World health organisation (Světová zdravotnická organizace)

## SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1: Funkce normálního tau proteinu. ....	5
Obr. 2: Imunoreaktivní značení primární protilátkou proti fosforylovanému.....	6
Obr. 3: Elektronmikroskopické snímky buněčných kultur.....	6
Obr. 4: Fosforylace tau proteinu.....	7
Obr. 5: Jednotlivé fáze agregace beta amyloidu.....	8
Obr. 6: Štěpení lidského APP neamyloidogenní cestou (vlevo) a štěpení na beta amyloid (vpravo). ....	9
Obr. 7: Agregace WT tau proteinu A) a tau proteinu s p.E372G mutací B) in vitro. ....	11
Obr. 8: Snížení počtu funkčních mitochondrií a narušení jejich transportu.....	15
Obr. 9: Fáze AD a způsoby detekce jejich biomarkerů v čase.....	17
Obr. 10: Zastoupení apolipoproteinu v mg/dl v mozkomíšním moku .....	19
Obr. 11: Aktivita fosfolipidového transportéru v nM/ml/h v mozkomíšním moku .....	19
Obr. 12: (A) výsledky chromatografické analýzy vybraných lipidů v likvoru 79-leté ženy.(B) Standardní hodnoty pro cholesterol a cholesteryl-oktanoát.....	21
Obr. 13: Obsah částic s apolipoproteiny v mikrolitru likvoru různých skupin osob.....	22
Obr.14: grafické znázornění statistické významnosti jednotlivých rozdílů v průměrných hodnotách hladin lipidů patientské a kontrolní skupině .....	32
Obr.15: Krabicový graf měření lipidů.....	33
Obr.16: Krabicový graf měření lipidů.....	34
Obr.17: Krabicový graf měření lipidů.....	35
Obr.18: Krabicový graf měření lipidů .....	36
Obr.19: Krabicový graf měření lipidů.....	37
Obr.19: Výsledky srovnatelné lipidomické analýzy, zaměřené na diacylglyceroly s různými MK.....	38

## SEZNAM TABULEK

Tab.1 obsah vybraných lipidických molekul v likvoru a séru zdravých osob a pacientů s onemocněními mozku .....	20
Tab.2 Fosfatidylcholiny .....	30
Tab.3 Fosfatidylcholiny s alkylovými a alkenylovými substituenty .....	31
Tab.4 Fosfatidyletanolaminy .....	31
Tab.5 Sfingomyeliny .....	31

# 1. Úvod

Společným znakem onemocnění zvaných tauopatie je nesprávná lokalizace a posttranslační úpravy Tau proteinu (tubulin-associated unit). Tau protein slouží ve zdravém neuronu ke stabilizaci mikrotubulů. Patologicky pozměněný protein ztrácí svou rozpustnost i vazbu na mikrotubuly a polymeruje do spirálovitých vřetének, která mohou tvořit agregáty s dalšími proteiny (Jouanne, et al. 2017). Agregáty jsou pro buňku škodlivé a hyperfosforylovaný tau protein neplní svou funkci stabilizace mikrotubulů (Valentine et al. 2016). Zatímco u hyperfosforylovaného tau proteinu nebyla prokázána významná toxicita, oligomery beta amyloidu v buňkách jsou vysoce toxické (Chang et al. 2017).

Nejvýznamnější příčinou demence je Alzheimerova nemoc, u níž se kombinují projevy tauopatie s beta amyloidovými agregáty v mezibuněčném prostoru (Alves et al. 2010). Neuron zasažený AD přestává plnit svou funkci, s postupem nemoci dochází k apoptoze neuronů, dysregulaci neuronové sítě a narušení fungování mozku.

Demence je nevyлéčitelné onemocnění a končí smrtí pacienta, u Alzheimerovy nemoci do 5-7 let od diagnózy.

Klinická diagnostika je založena na detekci beta amyloidu a tau proteinu v krvi a mozkomíšním moku, na poměrně náročných zobrazovacích metodách. Méně náročné diagnostické metody a hledání dalších metabolických abnormalit jsou stále předmětem výzkumů.

Studii zabývající se čistě lipidy v mozkomíšním moku bylo provedeno méně, nejzajímavější výsledky byly pozorovány u cholesterolu a jeho metabolitů (Loera-Valencia et al. 2019)

V této práci se zabýváme změnami lipidomického profilu mozkomíšního moku u pacientů s AD ve srovnání se zdravými kontrolami. K analýze vzorků byla použita tandemová hmotnostní spektrometrie.

Objev specifických biomarkerů by přispěl k diagnostice před rozvojem klinických příznaků a včasnému nasazení podpůrné léčby.

## 2. Cíle práce

- Vypracování literární rešerše na téma: lipidomika, molekulární biomarkery AD, kapalinová chromatografie a tandemová hmotnostní spektrometrie, metabolomika, dědičné metabolické poruchy, které vedou k AD.
- Cílená lipidomická analýza likvoru pomocí LC/MS
- Zpracování dat základními statistickými metodami a identifikace nejvíce signifikantních analytů

### 3. Literární přehled

#### 3.1 Alzheimerova choroba (AD)

Alzheimerova choroba patří mezi do rozsáhlé skupiny onemocnění zvaných neurodegenerativní proteinopatie. U těchto chorob dochází s postupem věku v neuronech ke zvyšující se zátěži množstvím nesprávně složených nebo toxických proteinů, často tvořících nerozpustné shluky (agregáty). Tato zátěž vede k poškození struktury a funkce neuronů až k jejich zániku, což se projevuje progredujícími poruchami kognitivních funkcí, případně dalšími neurologickými příznaky. Proteinopatií je celá řada, vyskytují se na genetickém základě (např. Huntingtonova chorea), nebo s nejasnými příčinami spojení genetických i environmentálních faktorů (např. Alzheimerova choroba).

Nesprávně složené proteiny způsobují v buňce celou řadu poruch, včetně poškození mitochondrií a selhání energetického metabolismu (Kawamata a Manfredi 2017). V buňkách zasažených AD bylo opakovaně pozorováno snížené množství ATP a změny v elektrontransportním řetězci (Bosetti et al. 2002). Nedostatek ATP narušuje biosyntézu v buňce, schopnost odstraňovat toxické produkty, i funkci neuronu. Zvyšuje riziko excitotoxické smrti neuronu (Verma, Wills, a Chu 2018).

Alzheimerova choroba patří mezi tauopatie – poruchy spojené s narušením posttranslačních modifikací tau proteinu, které vedou ke ztrátě jeho funkce a k tvorbě škodlivých agregátů. Tauopatií je asi 20 a dělí se na tauopatie bez asociace s dalšími proteiny (např. neurofibrilary tangle dementia), tauopatie asociované s beta amyloidem (Alzheimerova nemoc) a tauopatie asociované s jinými proteiny (Kovacs 2017).

Zhruba 5% případů AD je způsobeno geneticky (tzv. familiální AD) a nástup nemoci je velmi časný – již mezi 30 a 60 lety věku. Příčinou je mutace v APP genu pro prekurzor beta amyloidu (Hardy 2017), nebo v presenilinu 1 (Kelleher a Shen 2017) a presenilinu 2 (Fedeli et al. 2019) což jsou geny pro enzymy štěpící APP na beta amyloid).

Zbýlých 95% případů, tzv. sporadická forma AD, je způsobena více faktory a nastupuje v pozdějším věku. Uvádí se, že AD trpí až 35 milionů osob, jedná se tedy o nejčastější příčinu demence (Karlíková et al. 2017). Alzheimerova nemoc je nevyléčitelná, vede k postupujícímu rozpadu osobnosti pacienta a nevyhnutelně končí smrtí, obvykle do 5-7 let od diagnózy (Alzheimer's Association 2016). Současná léčba se zaměřuje na zpomalení některých příznaků, podporu mozkové činnosti a podpůrnou psychoterapii.

Podle některých studií pomáhá demenci zpomalit také intenzivní trénink paměti a kognitivních funkcí. Trénink ovlivňuje nejen schopnosti pacientů, ale i patofyziologické projevy nemoci v mozkové tkáni (Rossi Dare et al. 2019).

Typickým histologickým nálezem u AD jsou extracelulární plaky beta amyloidu a intracelulární vřeténka tau proteinu, doprovázející postupný úbytek a strukturální abnormality nervových buněk.

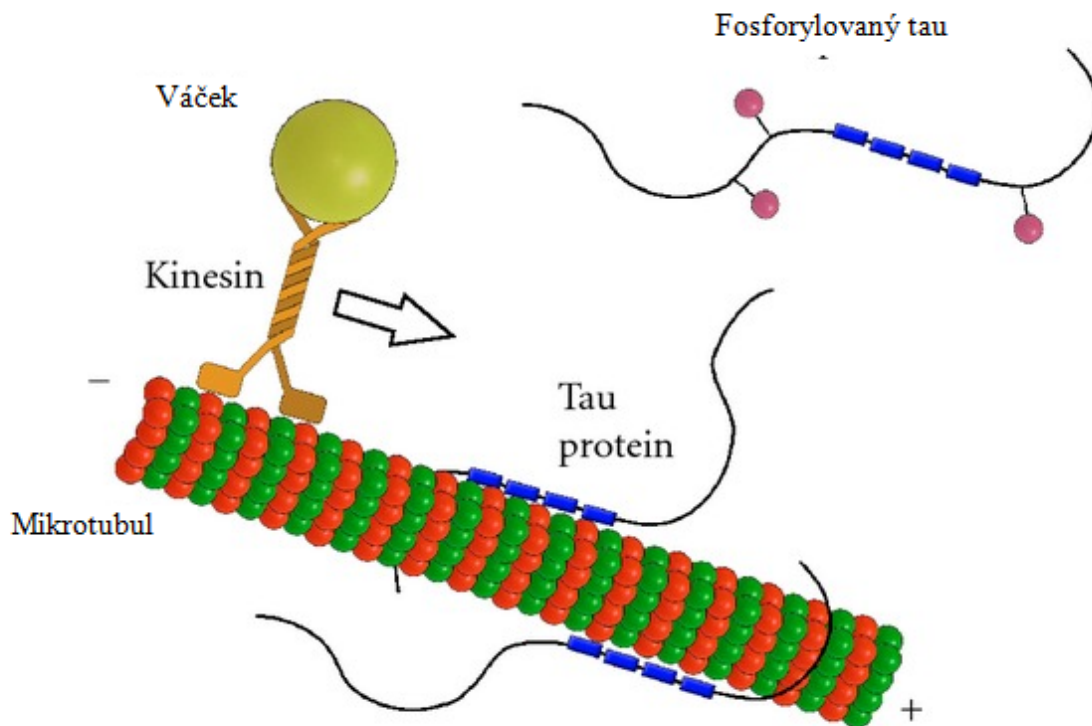
### **3.1.1 Tau protein – funkční (normální) x hyperfosforylovaný**

Ve zdravém neuronu hrají Tau proteiny (tubuline associated unit) nezastupitelnou roli při regulaci stability axonálních mikrotubulů, zejména v distální části. Patří do rodiny MAP (microtubule-associated protein; proteiny asociované s mikrotubuly). Nejvíce se vyskytuje v neuronech, najdeme ho v malé míře také v astrocytech a oligodendrocytech.

Gen pro tau protein, MAPT (microtubule-associated protein tau), leží na dlouhém raménku 17. chromosomu. Z tohoto genu se alternativním sestřihem translatují všechny tau proteiny (existuje 6 isoform, z nichž 3 mají 3 vazebná místa pro tubulin, a 3 isoformy mají 4 vazebná místa).

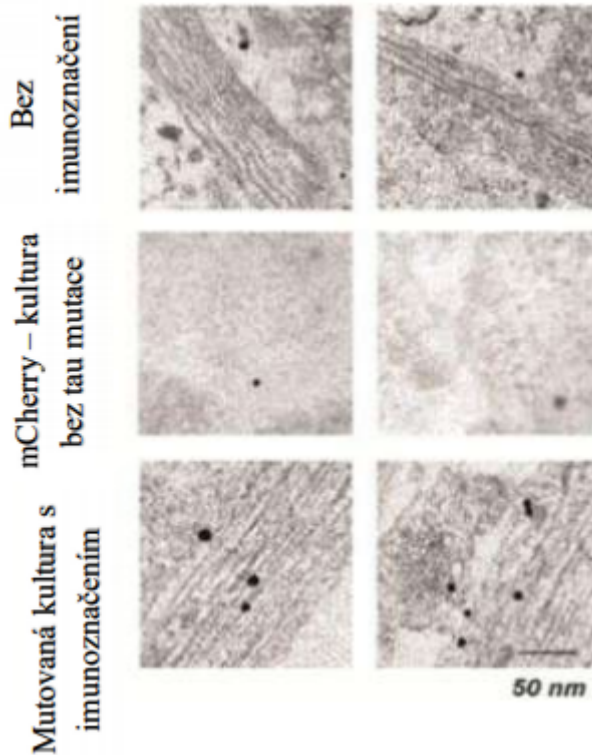
Myši s knock-outovaným genem MAPT nevykazovaly výrazné známky neuropatologie – pravděpodobně proto, že roli tau proteinu převzaly jiné MAPs. Určité odchylky ve stabilitě mikrotubulů však pozorovány byly (Harada et al. 1994). Na obrázku 1 vidíme zjednodušené schéma funkce tau protein. Nejdelší forma proteinu má 4 domény, které se vážou na tubulin. Vazba tau proteinu stabilizuje strukturu mikrotubulu a zastavuje kinesinový transport váčků směrem k plus konci vlákna. Rovnáha jeho navazování a uvolňování z mikrotubulů je zajišťována pomocí kináz a fosfatáz (fosforylací ztrácí tau afinitu k tubulinu). Převzato z (Kolarova et al. 2012).





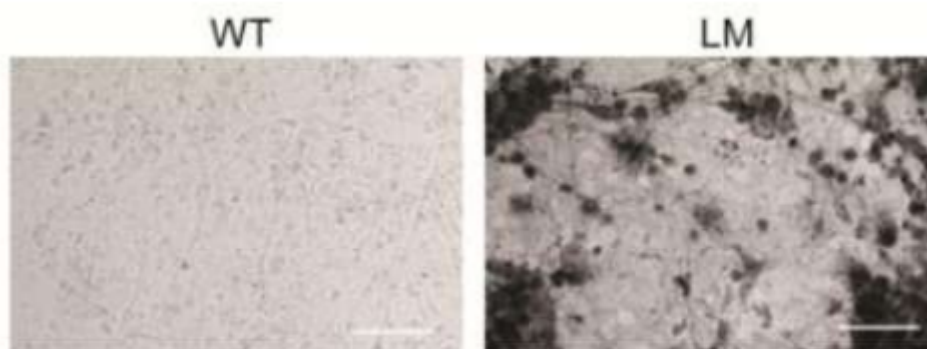
1.Obr. 1: Funkce normálního tau proteinu.

(Reilly et al. 2017) zkoumali (Harada et al. 1994) kulturu lidských indukovaných kmenových buněk, do nichž uměle zavedli mutaci v genu pro tau protein v P301L and V337M doménách a zmnožili tento gen, aby byl exprimován v podobném množství, jako v post mortem zkoumaných mozcích pacientů s AD. Mutovaný protein tvořil agregáty, působil poškození buněk a byl buňkami aktivně exocytován. To podporuje hypotézu možného přenosu jadérek agregátů mezi buňkami a šíření škodlivé konformace proteinu podobně, jako se šíří priony (do dalších buněk se může dostávat retrográdním axonálním transportem). Na Obrázku 2 vidíme imunoreaktivní značení primární protilátkou proti fosforylovanému tau proteinu, které ukazuje jeho agregáty u buněčného modelu tauopatie. V kontrolní kultuře buněk bez mutace nejsou patrné žádné agregáty, stejně jako na kontrolních snímcích, kde nebylo použito imunoznačení proti fosforylovanému tau proteinu. Obrázky buněčné kultury byly pořízené elektronovým mikroskopem, měřítko představuje 50nm. Převzato z (Reilly et al. 2017).



2.Obr. 2: Imunoreaktivní značení primární protilátkou proti fosforylovanému

Na Obrázku 3 vidíme elektronmikroskopické snímky buněčných kultur, vlevo s běžným tau proteinem a vpravo s mutacemi v P301L and V337M doménách. Fosforylovaný tau protein byl značený protilátkami se stříbrem. Vpravo vidíme velké množství tmavých objektů představujících agregáty mutovaného proteinu. Měřítka představuje 50nm. Převzato z (Reilly et al. 2017).

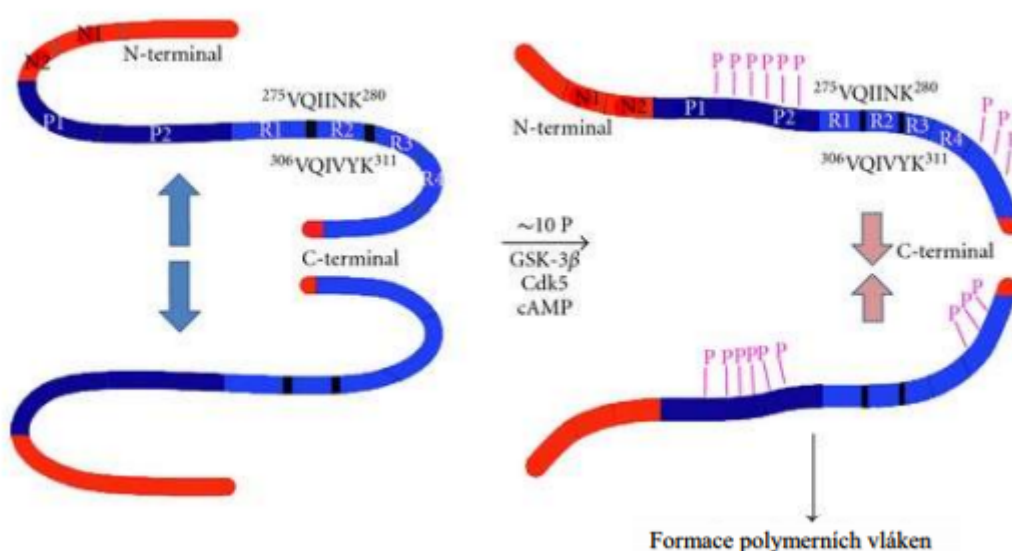


3.Obr. 3: Elektronmikroskopické snímky buněčných kultur

Toxicita neagregovaného nesprávně modifikovaného tau proteinu je diskutabilní. Zatímco některé studie neprokázaly významný rozdíl mezi normálním a mutovaným tau proteinem (Chang et al. 2017), jiné považují jeho oligomerní formu za nejtoxičtější agens u AD

(d'Orange et al. 2018) a navrhuji hypotézu, že tvorba velkých agregátů pomáhá buňkám zbavit se toxických oligomerů a prodloužit své přežití. Možné vysvětlení rozdílných výsledků studií je, že ne všechny mutantní formy tau proteinu náchylné k agregaci tvoří stejný typ rozpustných oligomerů.

Na obrázku 4 vidíme žene fosforylovaný protein se váže na tubulin doménami R1, R2, R3 a R4. Oblasti směrem k N- a C- konci od vazebných domén inhibují vazbu s jiným tau proteinem. Fosforylací inhibičních oblastí (v obrázku vyznačeno růžovým P) se ztrácí jejich inhibiční funkce a dochází k interakci mezi jednotlivými molekulami tau proteinů. Vznikají toxické oligomery a následně větší agregáty. Převzato z (Kolarova et al. 2012).



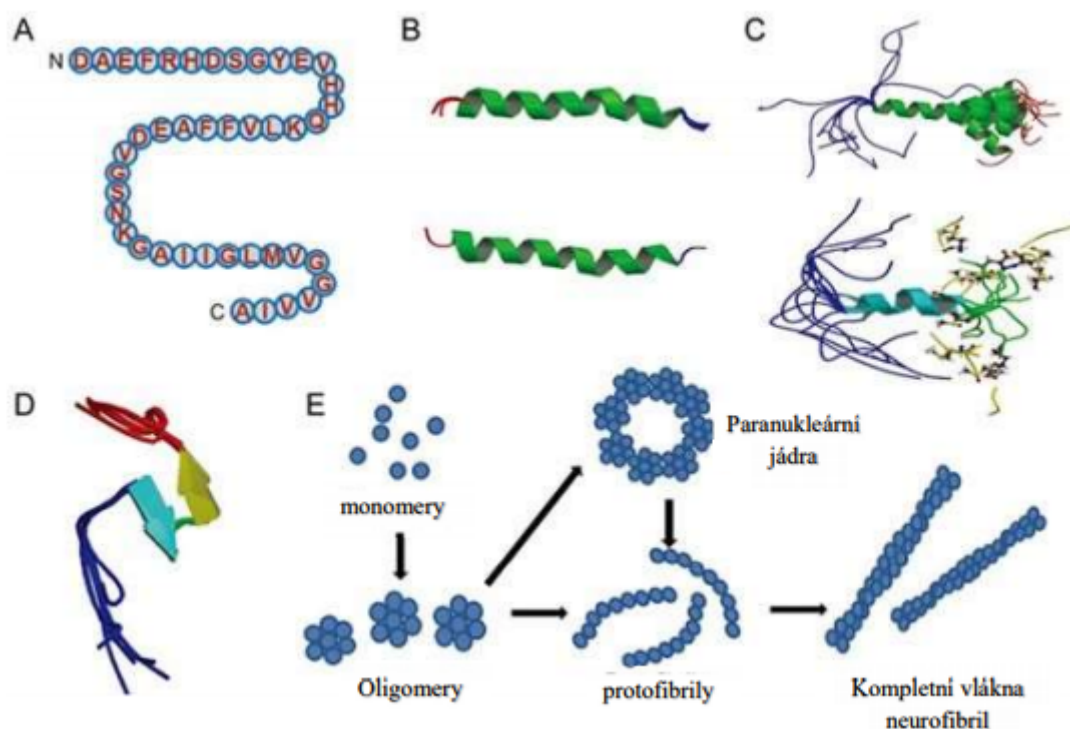
Obr. 4: Fosforylace tau proteinu.

### 3.1.2 Beta amyloid

Beta amyloid je vláknitá proteinová struktura složená z 36-43 aminokyselin. Má tendenci agregovat a tvořit vláknité neurofibrily narušující strukturu a funkci mozkové tkáně. Větší míru neurotoxicity však vykazují rozpustné oligomery beta amyloidu. Na obrázku 5 vidíme různé stupně agregace proteinu:

A) Aminokyselinová sekvence proteinu obsahující 42 aminokyselin B) Hlavní část proteinu (28 AK) tvoří alfa helikální strukturu. V prostředí podobném membránám může nabývat

struktury beta skládaného listu. C) Konformace rozpustného proteinu ve vodném prostředí. Ztrácí se alfa helikální struktura a vlákna vzájemně interagují na základě vodíkových můstků. D) Protein zkolabovaný do chaotických smyček a vláken, bez pravidelné helikální struktury. E) Monomery proteinu se navzájem shlukují v oligomery, které vytvářejí jádra budoucích protofibril. Ty se navzájem podélně spojují v neurofibrily, typický histologický nález u AD. Upraveno dle (Chen et al. 2017).

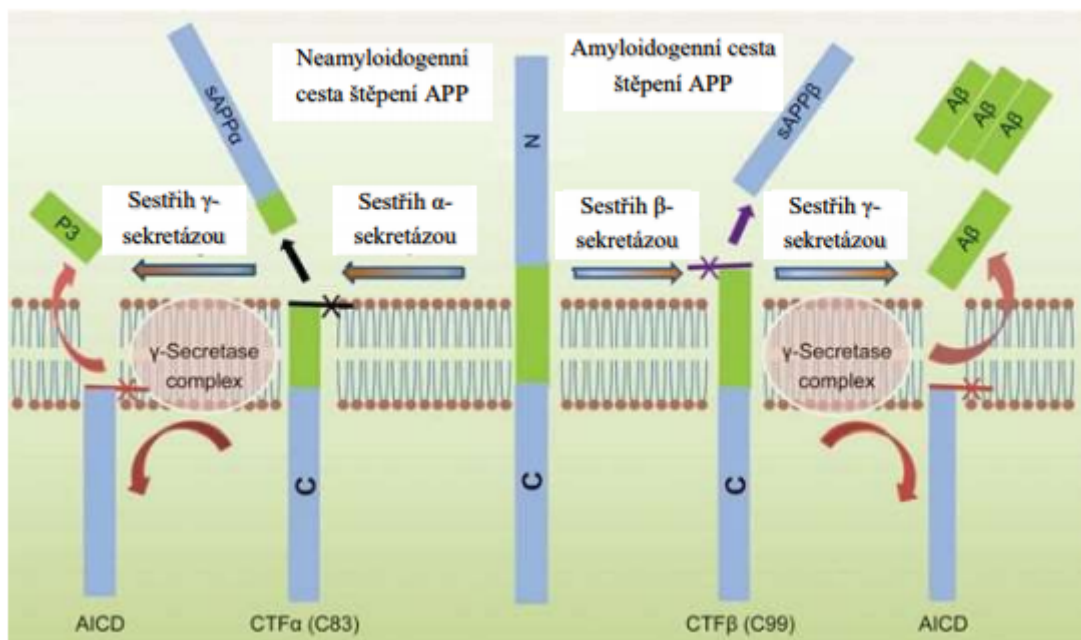


Obr. 5: Jednotlivé fáze agregace beta amyloidu.

Beta amyloid vzniká z APP (amyloidní prekurzorový protein) štěpením pomocí enzymu beta-sekretázy. Ve zdravém organismu štěpí tento enzym cca 10% APP. Číslo se mění vlivem věku, prostředí, ale také genetické variability v APP genu. Po odštěpení části proteinu beta sekretázou je toxický zbytek uvolněn z membrány pomocí gama sekretáz (Obr. 6). Beta i gama sekretázy se nejvíce nacházejí v lipidových raftech, tedy oblastech bohatých na cholesterol. Nárůst hladiny membránového cholesterolu vede ke zvýšenému štěpení APP na beta amyloid.

Druhý způsob štěpení APP, pomocí alfa-sekretázy, nevytváří nerozpustné beta-amyloidy. Ve zdravém organismu je touto cestou štěpeno zhruba 90% APP. Vznikají rozpustné N-terminální fragmenty (sAPP $\alpha$ ), které působí neuroprotektivně. C-terminální fragmenty

(CTF $\alpha$ ) zůstávají v membráně a reagují s preseniliny. Produkty  $\alpha$ -štěpení APP mají mnoho různých funkcí v buněčné signalizaci, regulaci transkripce a regulaci synaptogeneze.



Obr.6: Štěpení lidského APP neamyloidogenní cestou a štěpení na beta amyloid.

Beta amyloid vzniká i ve zdravém mozku a je neurony hojně sekretován do mezibuněčného prostoru. Jeho biologická funkce však zatím nebyla plně objasněna, některé studie naznačují jeho funkci v regulaci množství synaptického a extracelulárního acetylcholinu (Kumar, Nordberg, a Darreh-Shori 2016).

### 3.1.3 Vliv agregátů (plaků) na mozek

Demence je závažné onemocnění mozkové tkáně způsobující postupný pokles kognitivních schopností, paměti a úsudku, změny osobnosti a emocí (hypománie, deprese, výkyvy nálad), ztráta schopnosti vykonávat běžné každodenní činnosti. V pokročilých stádiích nemocní ztrácejí orientaci v čase i prostoru, bloudí, nepoznávají blízké osoby, bývají podráždění až agresivní.

Přítomnost beta amyloidových plaků v mezibuněčném prostoru a tau-vřetének v cytoplasmě neuronů vede k poškození a odumírání nervových buněk, čím větší část mozku je zasažena, tím těžšími projevy demence pacient trpí. Kromě toho mohou vysokou neurotoxicitu vykazovat také rozpostné oligomery nesprávně složených proteinů. Někteří vědci se

domnívají, že tvorba agregátů by mohla být obranou proti působení těchto oligomerů, tedy jakýmsi odkladištěm.

### **3.2 Genetické příčiny Alzheimerovy nemoci (Familiální AD)**

Familiální AD tvoří poměrně malé procento pacientů. Vyznačuje se dědičností onemocnění a časným nástupem klinických symptomů (již kolem 30. roku věku). Nemoc je obvykle způsobena mutacemi v prekurzorovém proteinu APP, který je díky nim náchylnější ke štěpení beta sekretázou. Existují také mutace v samotných enzimech sekretázách, které pak štěpí protein s větší pravděpodobností amyloidogenní cestou. Mutace v tau proteinu způsobují jeho snazší fosforylaci a náchylnost k tvorbě agregátů. Riziko vzniku AD ovlivňují i další proteiny, například genetická variabilita v apolipoproteinu-ε, který zajišťuje transport cholesterolu do neuronů (Liu et al. 2013).

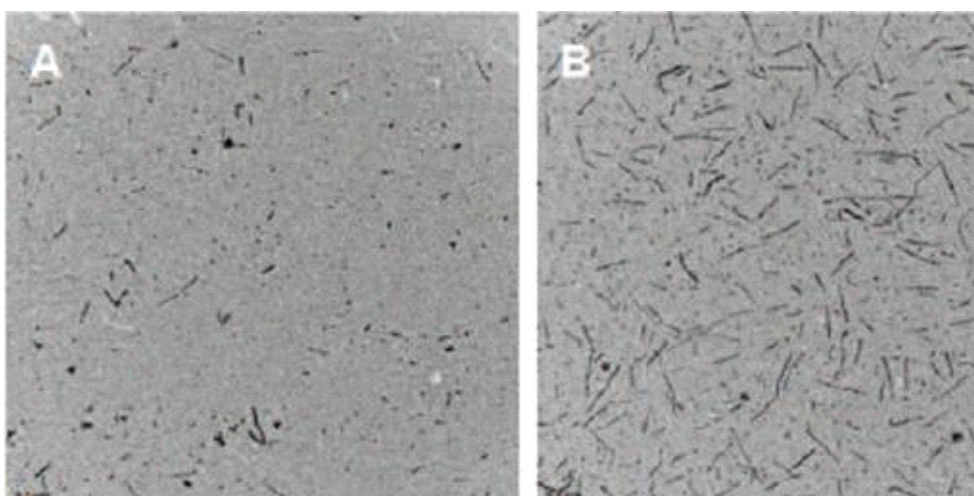
#### **3.2.1 Mutace APP poblíž míst štěpení beta a gama sekretázami**

Bylo objeveno mnoho mutací APP genu, které zvyšují riziko Alzheimerovy nemoci, ale také jedna mutace snižující toto riziko, což bylo prokázáno zavedením této mutace do myšního genomu (Nagata et al. 2018). Mutace v APP genu jsou obvykle dominantní, ke zvýšení rizika nemoci stačí jedna mutovaná alela. Byla však zdokumentována i recesivní alela, zvyšující riziko pouze u homozygotů. Pokud byly agregáty vzniklé štěpením mutovaného APP inkubovány in vitro s běžným APP proteinem, stávaly se agregáty nestabilními a nedocházelo k vzniku amyloidních plaků (Di Fede et al. 2009). Existuje mutace způsobující časný nástup (familiální) Alzheimerovy nemoci u homozygotů, ale bránící agregaci beta amyloidu u heterozygotů. Těchto poznatků by mohlo být využito v léčbě (Di Fede et al. 2012).

#### **3.2.2 Mutace v Tau protein**

Mutace v tau proteinu způsobují různá onemocnění projevující se demencí. Jedno z těchto onemocnění se nazývá frontotemporální demence s parkinsonismem, spojená s mutacemi 17. chromozomu. (Tacic et al. 2017) srovnává kazuistiky tří pacientů s frontotemporální demencí a dvěma různými mutacemi v tau proteinu (v exonu 13): mutaci p E372G a mutaci p.G389R.

Pacient s první zmíněnou mutací začal vykazovat projevy demence vyznačující se progresivní afázií (ztrátou schopnosti slovní komunikace) ve 40 letech. Druhá mutace se u pacientů projevila ve 24 a v 53 letech věku, s podobným fenotypem. Z neurobiologického hlediska byla pozorovatelná Pickova tělíska (inkluze mutovaného proteinu) a aktivace imunitních buněk v bílé hmotě reagující na tau protein se třemi i čtyřmi vazebnými doménami). Vliv mutací na agregaci tau proteinu byl prokázán také in vitro, to je znázorněno na obrázku 7. Na obrázku B vidíme výrazně více vláknitých agregátů. Fotografie z elektronového mikroskopu. Převzato z (Tacik et al. 2017).



Obr. 7: Agregace WT tau proteinu A) a tau proteinu s p.E372G mutací B) in vitro.

V článku je také přehled kazuistik dalších mutací v exonu 13, způsobujících frontotemporální demenci, Alzheimerovu nemoc, kortikobazální syndrom a progresivní agramatickou afázií s a nebo bez extrapyramidových symptomů. Jeden z autorů popisuje pacienta s juvenilní frontotemporální demencí, který zemřel v pouhých 24 letech. Mezi jeho příbuznými byl vysoký výskyt demence demence. Pacient a jeho rodina byli nositeli mutace p.G389R (Chaunu et al. 2013). Další z případů manifestace tauopatie ve velmi nízkém věku byl pacient s toutéž mutací, který následkem onemocnění zemřel již v 22 letech.

### 3.2.3 Mutace v presenilinových genech

Preseniliny jsou integrální membránové proteiny působící jako katalytické podjednotky enzymového komplexu gama sekretázy. U člověka existují dva preseniliny PSEN1 a PSEN2. Dominantních mutací v některém z nich, které způsobují AD bylo objeveno více než 160,

příčemž vyřazení (knock-out) presenilinových genů u myši vedlo k neurodegeneraci a symptomům podobným AD i bez přítomnosti beta amyloidových plaků (Saura et al. 2004).

### **3.2.4 Další rizikové geny**

Apolipoprotein-ε zajišťuje v organismu lipidovou homeostázu díky schopnosti transportovat lipidy mezi jednotlivými buněčnými typy. V CNS je produkován zejména astrocyty a slouží k transportu cholesterolu do a z neuronů (Liu et al. 2013). Jeho mutace byly první genetickou abnormalitou s prokázaným rizikem AD. Studie na 7625 pacientech s AD odhalila, že nositelé alely APOE ε4 onemocněli AD v průměru o 2,3 roku dříve než homozygotní nositelé běžné APOE ε3 alely (LoBue et al. 2017).

Genetická variabilita v lipidovém přenašeči APOE ovlivňuje riziko AD díky různé rychlosti fungování různých alel tohoto transportéru. Nejméně efektivní je APOE ε4, homozygoti s touto mutací mají riziko nejvyšší. Tato alela snižuje schopnost buněk odstraňovat beta amyloid, nejspíše vlivem celkového zpomalení metabolismu neuronů. Zpomalení transportu triglyceridů mezi neurony a zásobárnou lipidových kapének v gliích může zvyšovat hladinu volných kyslíkových a hydroxylových radikálů, protože dochází k předčasné oxidaci mastných kyselin. Nejběžnější je alela APOE ε3. Existuje ještě alela APOE ε2, která kóduje nejefektivnější přenašeč a snižuje riziko rozvoje AD (Stoykovich a Gibas 2019).

## **3.3 Negenetické příčiny (Sporadická AD)**

U velké většiny případů AD nelze určit přímá genetická příčina. Onemocnění nastává v těchto případech obvykle až v pozdním věku (60-70 let) a souvisí s vyčerpáním obranných zdrojů organismu proti neurodegeneraci. Roli hrají také vlivy prostředí a životní styl.

### **3.3.1 Věk a vlivy prostředí**

Statistická analýza na velkém souboru dat odhalila souvislost mezi obsahem hliníku a fluoridu v pitné vodě a rizikem demence. Ze sledovaných 6990 lidí jich onemocnělo v průběhu stárnutí demencí 1972. Rozdíl v počtu nemocných mezi oblastí s nejnižším a nejvyšším obsahem fluoridů byl až dvojnásobný (Russ et al. 2019).



Diskutuje se také o vlivu traumatického poranění mozku na rozvoj a závažnost Alzheimerovy choroby. Některé studie statisticky významnou souvislost nepotvrdily. Podle studie (LoBue et al. 2017) na 7625 pacientech však ti, kdo referovali úraz hlavy, začali trpět AD průměrně o 2,5 roku dříve než pacienti, kteří úraz neprodělali. Vliv věku, kdy k úrazu došlo, jeho závažnosti a četnosti úrazů zkoumán nebyl.

Z hlediska životního stylu má největší vliv strava a zdraví kardiovaskulárního systému, režim spánku a bdění a fyzická a mentální aktivita. Ne všechny studie však podobný vztah potvrdí. Studie provedená na celkem 464 pacientech s mírnou formou narušení kognitivních funkcí odhalila vztah mezi mírou onemocnění a biomarkery AD v mozkomíšním moku, ale nikoli mezi onemocněním a sledovanými faktory životního stylu (Reijs et al. 2017).

Jedním z mechanismů, jak může špatný životní styl ovlivnit procesy vedoucí k tauopatii a amyloidóze, je narušení insulinové regulace metabolismu (Fernandez, Santi, a Torres Aleman 2018).

### **3.3.2 Snížení obrany před nesprávně složenými proteiny (Autofagie, ubikvitinový systém...)**

Autofagie je jedním z klíčových mechanismů ochrany buňky před hromaděním nesprávně složených proteinů. Slouží především k degradaci proteinů s delší životností, větších agregátů nebo celých organel. Narušení tohoto mechanismu se podílí na vzniku patologických změn u AD (Q. Li, Liu, a Sun 2017).

Jedna ze studií zkoumala autofagii na myším modelu AD (vzniklý injekcí mutovaného genu pro tau protein na virovém vektoru AAV-hTauP301L do mozku) a buněčném modelu z lidské buněčné kultury. Podávání relativně nízkých dávek hormonu melatoninu (10 mg/kg) by mělo zvýšit aktivitu autofagické degradace proteinů. Neléčené myši vykazovaly již 7 dní po injekci virového vektoru změny podobné těm při AD: zvýšený oxidativní stres, projevy zánětu a zvýšené množství hyperfosforylovaného tau proteinu v hipokampu. Po 7 dnech ještě nebyly zřejmé změny kognitivních funkcí, ty však byly patrné po 28 dnech od injekce. Pokud byl 7 dní po injekci, tedy v době, kdy již nastaly fyziologické změny, podán melatonin, došlo ke snížení oxidativního stresu, hyperfosforylace a k zastavení odumírání buněk. Zároveň došlo ke zvýšení aktivity autofagie. Kognitivní změny byly po 28 dnech méně patrné. Podávání melatoninu nebo jeho derivátů by mohlo být jedním ze způsobů, jak pozitivně ovlivnit stav pacientů s AD (Luengo et al. 2019).

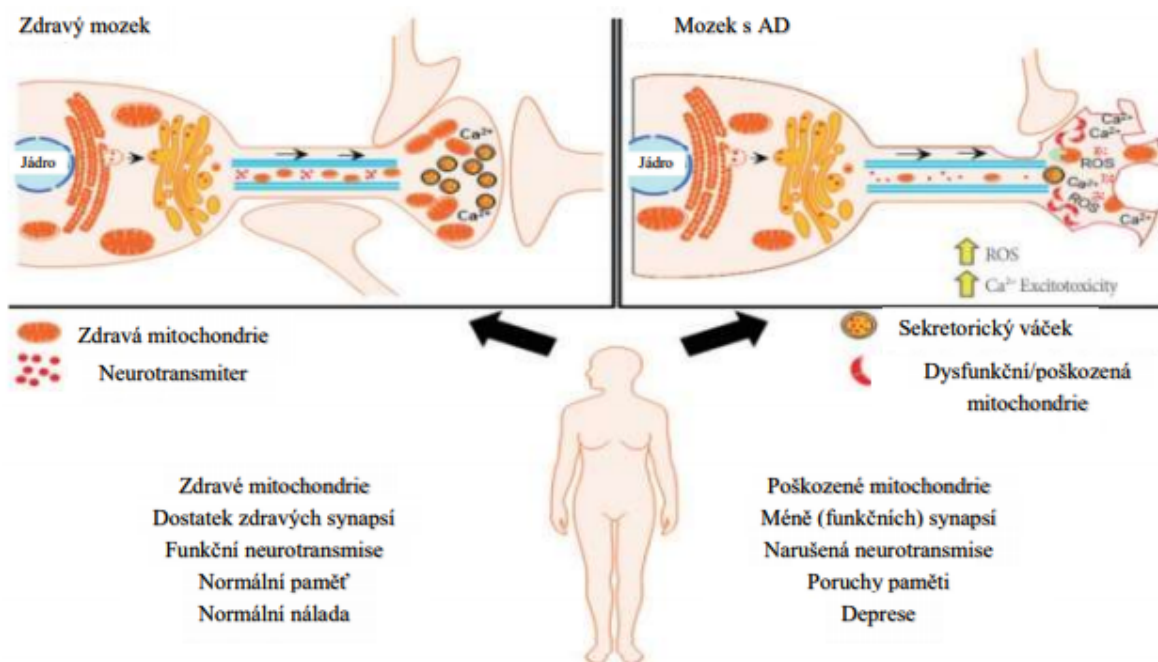
Dalším významným mechanismem pro degradaci škodlivých proteinů je ubikvitinový systém. Chaperony se podílejí na udržení správné konformace proteinů a pokud to již není možné, označují je k likvidaci v proteasomu. Zatímco autofagii lze odstraňovat i větší agregáty, proteasomové komplexy je naštípát nedokážou. Je proto potřeba obou těchto systémů. Oběma zároveň hrozí u proteinopatií přehlcení a dysfunkce (Ihara, Morishima-Kawashima, a Nixon 2012).

Přítomnost rozpustných oligomerů beta amyloidu dokáže sama o sobě narušit fungování proteasomů, čímž dále znesnadňuje degradaci škodlivých proteinů a urychluje jejich akumulaci. Oligomery A $\beta$ 42 i A $\beta$ 40 se ukázaly být pro proteasomy toxicitějšími než monomery (Tseng et al. 2008).

### **3.3.3 Poruchy mitochondrií a energetického metabolismu, oxidativní stress**

Poškození mitochondrií vede k narušení fungování synapsí u Alzheimerovy nemoci. Ve zdravém neuronu funguje dynamický transport mitochondrií mezi tělem neuronu a vzdálenými axony. To pomáhá udržovat vápníkovou rovnováhu, předcházet excitotoxicitě a odstraňovat reaktivní volné radikály. Mitochondrie jsou přesouvány tam, kde je jich zrovna zapotřebí k udržování homeostázy, neurotransmise a synaptické plasticity. Patologické změny mitochondrií u Alzheimerovy nemoci narušují plynulost transportu a způsobují snížení hustoty mitochondrií. Následkem toho dochází k dysregulaci vápníkové rovnováhy, nárůstu množství volných radikálů a k degeneraci synapsí. (Tang, Oliveros, a Jang 2019)

To je znázorněno na obrázku 8.



Obr. 8: Snížení počtu funkčních mitochondrií a narušení jejich transportu

### 3.3.4 Vliv zánětu

U Alzheimerovy nemoci byly detekovány zánětlivé procesy v zasažených oblastech mozku. Pokusy zlepšit stav pacientů s mírnými kognitivními poruchami souvisejícími s AD pomocí snižování aktivity imunitního systému v CNS byly spíše neúspěšné. Nové naděje jsou vkládány do přístupů cílících na snížení systémového chronického zánětu – tedy dlouhodobé aktivace imunitního systému vznikající mimo CNS (Holmes 2013).

Zánět je dlouhodobě známým průvodním jevem neurodegenerativních onemocnění. Imunopatologické projevy v AD mozku zahrnují zvýšenou aktivitu komplementu, cytokinů a reaktivních molekul akutní fáze zánětu (například alfa 1-antichymotrypsin). Produkty aktivace komplementu se objevují v okolí amyloidních plaků a způsobují hromadění a aktivaci gliových buněk, podílejících se na odstraňování amyloidu (Fiala a Veerhuis 2010).

## 3.4 Molekulární biomarkery AD

Alzheimerova nemoc se projevuje řadou fyziologických změn ještě před nástupem klinických projevů demence. Změny na molekulární úrovni časově předcházejí histologickým změnám

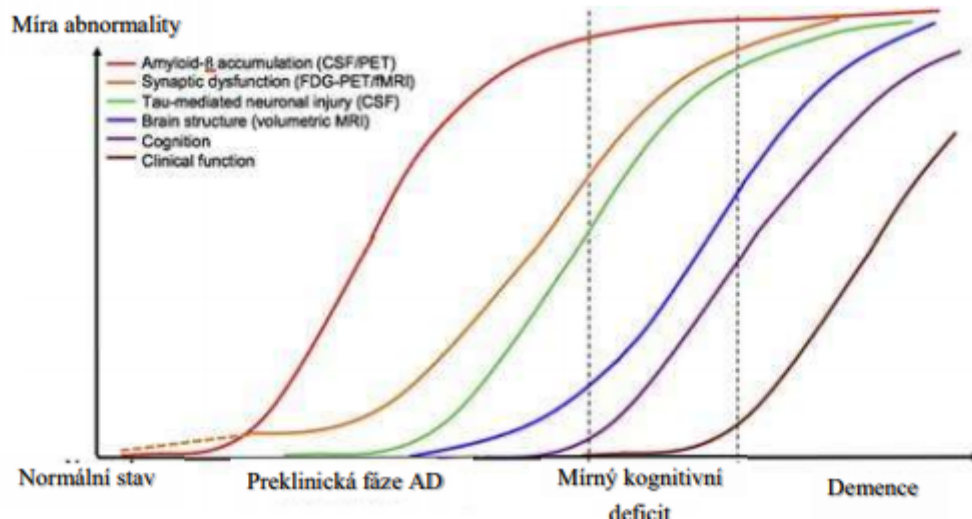
pozorovatelným zobrazovacími metodami. Analýzy vzorků krve nebo mozkomíšního moku lze proto využít v diagnostice onemocnění ještě před vypuknutím příznaků.

### 3.4.1 Biomarkery AD v klinické praxi

V současnosti jediným spolehlivým biomarkerem AD je snížená hladina beta amyloidu 42 a zvýšená hladina fosforylovaného tau proteinu v mozkomíšním moku. Čím extrémnějších hodnot tyto biomarkery dosahují, tím vyšší je pravděpodobnost úmrtí pacientů nad 85 let, a to bez ohledu na přítomnost a tíži symptomů demence (Ribbe et al. 2019).

Výše zmíněné biomarkery sice dokážou potvrdit podezření na AD a predikovat riziko úmrtí pacienta, ale jsou detekovatelné až v době, kdy již dochází k velkému zatížení mozku škodlivými proteiny. V této fázi již preventivní opatření nemají takový účinek. Velké úsilí je věnováno hledání biomarkerů, které by odhalily riziko rozvoje demence ještě před nástupem nevratného poškození neuronů. Jedním z těchto biomarkerů by mohla být abnormální reakce nespecifické imunity na některé proteinové agregáty a změny v procesu fagocytózy. Další možností časně diagnostiky by mohlo být sledování transkriptomických změn u makrofágů stresovaných zvýšeným množstvím amyloidů (Fiala a Veerhuis 2010).

Obrázek 9 ukazuje fáze AD a způsoby detekce jejich biomarkerů v čase. Na svislé ose vidíme míru narušení, na vodorovné čas. Červená křivka označuje akumulaci  $\beta$ -amyloidu detekovatelnou pomocí počítačové tomografie nebo analýzou mozkomíšního moku. Oranžová křivka představuje poruchy funkce synapsí, zjistitelné funkční magnetickou rezonancí nebo funkční počítačovou tomografií. Zelená křivka, časově nastupující po předchozích dvou, znázorňuje detekovatelné změny způsobené tau proteinem. Zjistit je lze z mozkomíšního moku. Modrá křivka zobrazuje změny struktury mozku, nastupující po objevení biochemických markerů. Strukturální změny se zjišťují pomocí volumetrické magnetické rezonance. Fialová křivka označuje pokles kognitivních funkcí, měřený standardizovanými psychologickými testy. Poslední tmavě fialová křivka značí pokles schopnosti pacienta fungovat v praktickém životě kvůli postupující demenci.



Obr. 9: Fáze AD a způsoby detekce jejich biomarkerů v čase

### 3.5 Lipidomika

Lipidomika se zabývá studiem souboru lipidů v organismu a jejich vzájemných vztahů. Je nejmladší vědou mezi tzv. „-omikami“ (genomika, proteomika, metabolomika...) a původně byla součástí metabolomiky.

Lipidy jsou nedílnou součástí buněčných membrán a přesná regulace jejich výskytu je nezbytná pro fungování veškerých membránových proteinů. Cholesterol snižuje fluiditu membrán a je základem pro lipidové rafty – méně pohyblivé oblasti membrány neuronu, která kotví specifické skupiny proteinů. Právě v těchto oblastech se vyskytuje velké množství beta sekretáz, způsobujících štěpení APP na škodlivý beta amyloid. Existují důkazy, že hypercholesterémie a poruchy transportu cholesterolu, spojené s vyšším obsahem cholesterolu v mozku, zvyšují riziko Alzheimerovy nemoci (Araki a Tamaoka 2015).

Případová studie 68-letého muže s diabetem II. typu a s mírnou formou AD, který byl heterozygotním nositelem APOE ε4 mutace, ukázala pozitivní účinky ketogenní diety. Došlo ke zvýšení citlivosti buněk na inzulin, normalizaci hladin krevních lipidů a zlepšení výkonu v standardních kognitivních testech (natolik, že již nesplňoval kritéria demence) (Stoykovich a Gibas 2019).

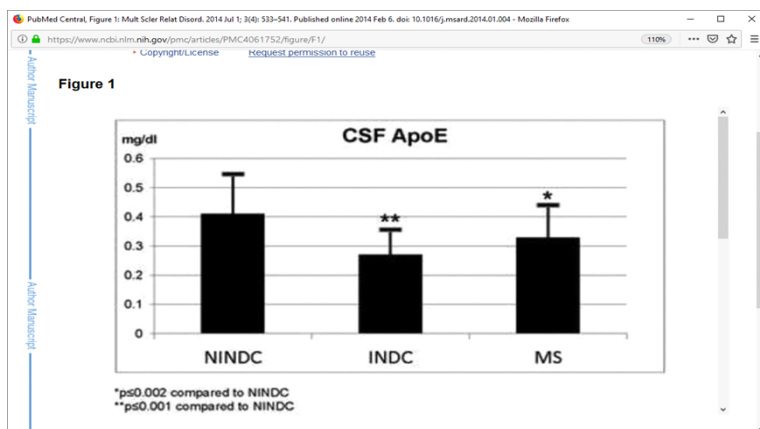
### 3.5.1 Lipidomický profil lidského mozkomíšního moku

Lidský mozkomíšní mok (likvor, CSF), kterého je v těle asi 150ml, zajišťuje výživu, imunitní a mechanickou ochranu mozku a míchy. Obsahuje velké množství různých typů lipidů (10-30 mg/l). Jejich složení je u zdravého člověka důkladně regulováno, a odlišnosti v zastoupení různých lipidových molekul mohou být užitečným diagnostickým nástrojem neurodegenerativních onemocnění.

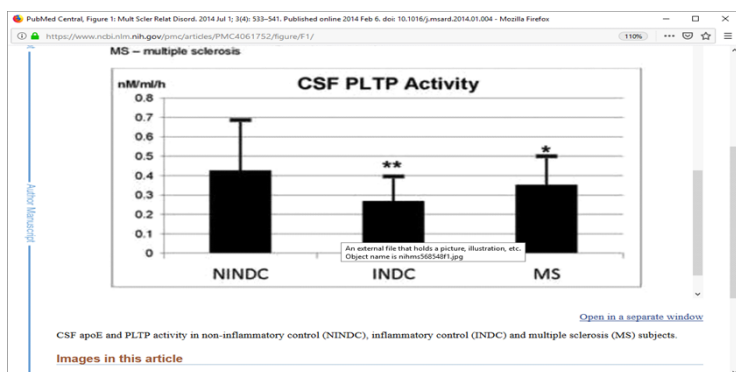
V likvoru se vyskytují sfingomyeliny složené z fosfatidylcholinu a ceramidu, N-acylsphingosiny, glucosylceramidy obsahující kyselinu sialovou navázanou na sacharidový řetězec, fosfatidylcholiny, etherové fosfolipidy, triglyceridy a triacylglyceroly složené z glycerolové kostry s třemi navázanými mastnými kyselinami, glykosfingolipidů, mastných kyselin s dlouhým řetězcem. Těchto lipidů s různým počtem uhlíků a dvojných vazeb, a jejich derivátů, je bezpočet. Studie zkoumající amyotrofickou laterální sklerózu srovnávala hladiny 124 různých lipidů u pacientů a kontrol. Lipidomický profil zdravých osob a pacientů s neurodegenerativním onemocněním se signifikantně lišil. Přesné definování specifického profilu u jednotlivých onemocnění pro účely diagnostiky je předmětem dalších výzkumů (Blasco et al. 2017).

Ve studii zahrnující 38 kontrol a 91 pacientů s roztroušenou sklerózou byly zjištěny odlišnosti v obsahu apoE (snížení u pacientů), snížení aktivity proteinu transportujícího fosfolipidy (PTLP), zvýšení obsahu fosforylovaného tau proteinu a u části pacientů i beta amyloidu v mozkomíšním moku oproti zdravým kontrolám. Ze 124 zkoumaných lipidů se zastoupení signifikantně ( $p < 0,05$ ) lišilo u 48 z nich. Hladina ApoE pozitivně korelovala s hladinou cholesterolu a 24-hydroxycholesterolu u všech skupin, aktivita PTLP korelovala s hladinou cholesterolu u kontrol ( $p < 0,05$ ) (Vuletic et al. 2014).

Obrázky 10 a 11 graficky znázorňují rozdíly mezi zdravými kontrolami, kontrolami s jiným než neurodegenerativním onemocněním a pacienty s roztroušenou sklerózou. NINC - zdravé kontroly INDC - pacienti s nezářlivým onemocněním mozku, MS - pacienti s degenerativním onemocněním roztroušenou sklerózou. Symbol \* označuje  $p < 0,002$  ve srovnání se zdravými kontrolami, \*\* znamenají  $p < 0,001$ .



Obr. 10: Zastoupení apolipoproteinů v mg/dl v mozkomíšním moku



Obr. 11: Aktivita fosfolipidového transportéru v nM/ml/h v mozkomíšním moku

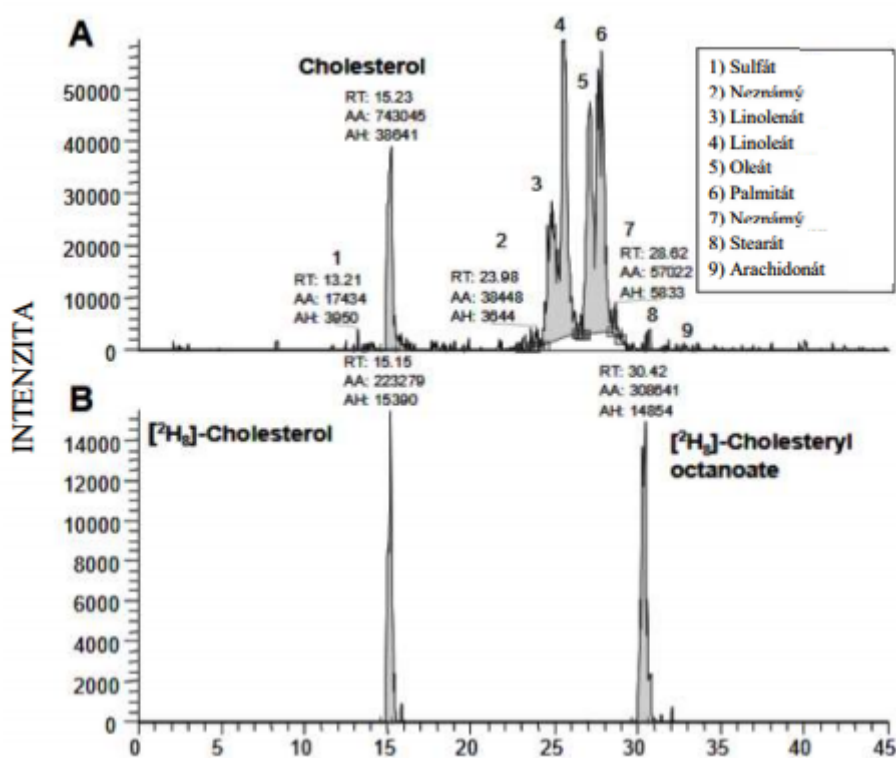
Tabulka 1 znázorňuje obsah vybraných lipidických molekul v likvoru zdravých osob a pacientů s onemocněními mozku. Hodnoty jsou uvedeny jednotkách ng/mg cholesterolu v likvoru a krevním séru. Grafy i tabulka byly převzaty z (Vuletic et al. 2014).

Tab.1 obsah vybraných lipidických molekul v likvoru a séru zdravých osob a pacientů s onemocněními mozku

	Zdravé kontroly	Nezánětlivá onemocnění CNS	Roztroušená skleróza
Cholesterol (ng/ml)	0.46 ± 0.26	0.50 ± 0.28	0.49 ± 0.70
Latosterol <sup>1</sup>	0.66 ± 0.16	0.65 ± 0.14	0.75 ± 0.19
Campesterol <sup>1</sup>	1.98 ± 0.50	1.93 ± 0.44	1.93 ± 0.63
Sitosterol <sup>1</sup>	2.40 ± 0.63	2.29 ± 0.45	2.52 ± 0.79
Lanosterol <sup>1</sup>	0.51 ± 0.25	0.46 ± 0.19	0.56 ± 0.25
Desmosterol <sup>1</sup>	1.07 ± 0.34		0.77 ± 0.85
24-hydroxycholesterol <sup>1</sup>	451.9 ± 129.2	451.3 ± 108.6	443.2 ± 166.5
27-hydroxycholesterol <sup>1</sup>	1.25 ± 0.57		0.85 ± 0.65
Serum 24-hydroxycholesterol <sup>2</sup>	34.2 ± 7.5	34.2 ± 7.3	32.1 ± 9.1
Serum 27-hydroxycholesterol <sup>2</sup>	92.7 ± 48.6	88.4 ± 50.6	69.8 ± 53.0

Lipidomický profil mozkomíšního moku je v současnosti nejčastěji studován pomocí kombinace chromatografie a hmotnostní spektrometrie. Příklad výsledků takového měření najdete na obrázku 12. Zdroj: (Fonteh et al. 2006).



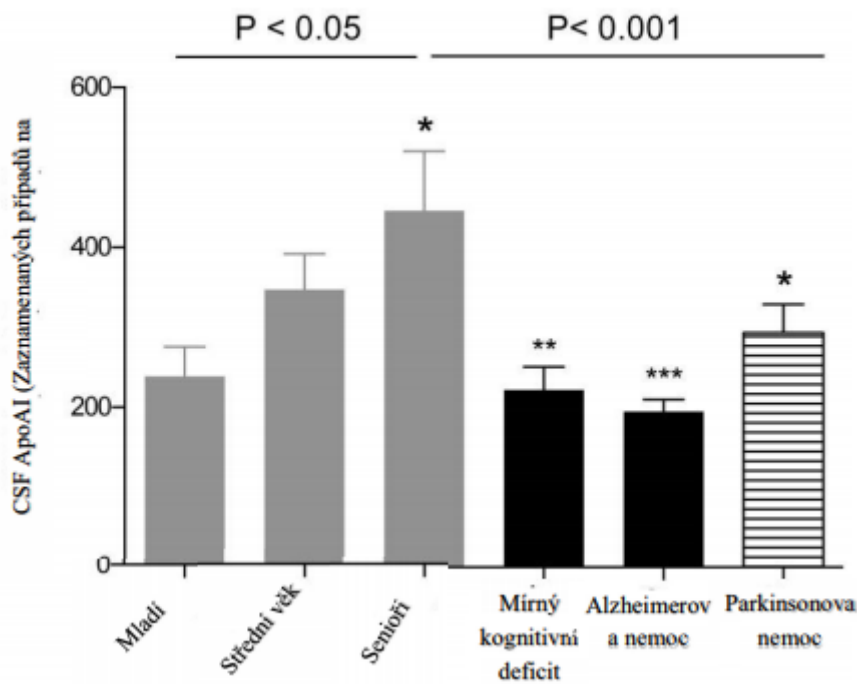


Obr. 12: (A) výsledky chromatografické analýzy vybraných lipidů v likvoru 79-leté ženy.(B) Standardní hodnoty pro cholesterol a cholesteryl-oktanoát.

### 3.5.2 Lipidomické odlišnosti u AD

Alzheimerova nemoc vykazuje podobné odchylky v lipidomickém profilu, jako v předchozí kapitole zmiňované neurodegenerativní choroby. U AD se oproti zdravým kontrolám signifikantně liší poměr větších a menších lipidových částic v mozkomíšním moku. Je také snížený počet částic obsahujících apolipoproteiny (přenašeče lipidů zajišťující jejich organizovaný transport pomocí receptorů) (Yang et al. 2015).

Na obrázku 13 vidíme že pacienti s poruchami kognitivních funkcí mají nejmenší zastoupení apolipoproteinu, což potvrzuje jeho dysfunkci u AD. Snížení, i když ne tak výrazné, lze vidět i u Parkinsonovy nemoci. Zdroj: (Yang et al. 2015).



Obr. 13: Obsah částic s apolipoproteiny v mikrolitru likvoru různých skupin osob.

### 3.5.3 Cholesterol a jeho deriváty

Mozek je orgánem s nejvyšším obsahem cholesterolu v těle. Jeho dlouhodobě zvýšená hladina nebo poruchy transportu se proto mohou projevit poruchami jeho funkce, zejména pokud existují mechanismy jeho excesivního průniku přes hematoencefalickou bariéru.

Na myších hipokampálních neuronech bylo prokázáno, že některé isoformy hydroxycholesterolu interagují s beta amyloidy a způsobují jejich agregaci, zatímco jiné isoformy tuto schopnost nemají (Křištofiková et al. 2012).

Za běžných podmínek je přístup cholesterolu a jeho derivátů do mozku výrazně regulován hematoencefalickou bariérou. Pokud je však narušena, například mikroporaněním cév nebo zánětem, může se cholesterol hromadit v membránách neuronů a měnit jejich vlastnosti. Vyšší koncentrace cholesterolu zvyšuje štěpení APP beta amyloidázou namísto alfa amyloidázy. Hypercholesterémie zvyšuje riziko AD o 54% oproti kontrolám, přičemž léčba pomocí statinů snižuje riziko onemocnění o 60-73% oproti neléčeným pacientům nebo pacientům léčeným jinými typy léků.

Při vyšší koncentraci amyloidu dochází ke vzniku neurotoxických rozpustných oligomerů, následně fibril a velkých agregátů. Excesivní tvorba agregátů je spojena s vysokou hladinou

enzymu butyrylcholinesterázy a Apolipoprotein-ε4 (APOE4) v mezibuněčném prostoru. Mutace v genu pro APOE4 je prokázaným rizikovým faktorem sporadické Alzheimerovy nemoci. Různé studie navíc prokázaly vzájemné interakce Apolipoprotein-ε4, butyrylcholinesterázy a β-amyloidu. Tyto interakce vedou k vzniku rozpustných extrémně reaktivních komplexů rozkládajících acetylcholin (tzv. BaβACs), a mohly by hrát roli v regulaci synaptické i extracelulární acetylcholinové signalizace. K vytvoření takové dynamické rovnováhy by byl zapotřebí enzym syntetizující acetylcholin v extracelulárním prostoru, a ten byl v lidské extracelulární tekutině nedávno skutečně objeven. Příliš vysoká hladina volného apolipoprotein-E narušuje beta amyloidovou regulaci funkce cholinesteráz a přispívá k patologické dysregulaci u Alzheimerovy nemoci (Kumar, Nordberg, a Darreh-Shori 2016).

Cholesterol a jeho deriváty mohou být citlivějším klinickým biomarkerem AD než dosud používané stanovení beta amyloidu, celkového tau proteinu a fosforylovaného tau proteinu v mozkomíšním moku. Metaanalýza 281 studií prokázala zvýšení cholesterolu u pacientů s mírným kognitivním deficitem a zvýšení jeho metabolitů 24-hydroxycholesterolu a 27-hydroxycholesterolu u pokročilejší formy AD. Těchto poznatků by mohlo být využito v diagnostice AD před nástupem klinických příznaků a k rozlišení podskupiny pacientů s narušeným lipidovým mechanismem, u nichž by ke zmírnění AD mohly pomoci např. statiny (H.-L. Wang et al. 2016).

Statiny, tedy léky snižující hladinu cholesterolu, mohou u kognitivně intaktních osob snižovat hladinu fosforylovaného tau proteinu v mozkomíšním moku. Vysoká hladina tohoto proteinu je přitom jedním z hlavních patologických mechanismů AD. Statiny, konkrétně byl použit Simvastatin, lze tedy využít k prevenci AD u osob s hypercholesterémií (G. Li et al. 2017).

Jedna ze studií srovnávala hladinu 24S-hydroxycholesterolu u celkem 107 osob v 5 skupinách podle míry narušení kognitivních funkcí (zdraví dobrovolníci, subjektivně vnímané zhoršení, mírný kognitivní deficit, pacienti s progresivním rozvojem AD a pacienti s rozvinutou Alzheimerovou demencí). Procento osob s abnormálně zvýšenou hladinou 24S-hydroxycholesterolu korelovalo s mírou deficitu u prvních 4 skupin, nejvyšší bylo ve skupině s progredujícím poškozením mozku. U již rozvinuté demence však byly hladiny opět nižší, zatímco hladiny klasických biomarkerů AD byly v této skupině nejvyšší. Výsledky naznačují, že 24S-hydroxycholesterol je citlivějším biomarkerem v časných fázích rozvoje AD, ale u již rozvinuté nemoci může dávat falešně negativní výsledky (Leoni et al. 2013).

HDL (high-density lipoprotein) a v něm obsažené apoA-I apolipoproteiny snižují pravděpodobnost rozvoje AD. Jsou produkovány ve střevě a játrech, a kromě vychytávání přebytečného cholesterolu mají také vasoprotektivní funkci. Jednorázová injekce rHDL signifikantně snížila hladiny rozpustného A $\beta$ 40 a A $\beta$ 42 u APP/PS1 myši, které jsou využívány jako model preklinické fáze amyloidózy. Účinek však vymizel po vyprchání HDL z organismu – v dlouhodobém měřítku (po 7 dnech) se léčené myši nelišily od neléčených v hladině rozpustného amyloidu v CSF, množství agregátů v mozku ani ve zvýšení zánětlivých markerů. HDL tedy působí pouze po dobu jeho zvýšené hladiny v organismu, po jeho vyloučení nezůstává žádný trvalý efekt (Robert et al. 2016).

Patologické hromadění cholesterolu v hipokampálních neuronech podporuje štěpení APP amyloidogenní cestou, pravděpodobně vlivem zvýšení výskytu lipidových raftů kotvících beta sekretázu. Hlavním mechanismem odstraňování přebytečného cholesterolu v mozku je jeho štěpení na 24S-hydroxycholesterol pomocí enzymu 24S-hydroxylázy.

Studie porovnávající hladiny 24S-hydroxycholesterolu v plasmě a likvoru 7 zdravých osob, 7 pacientů s mírnou kognitivní poruchou, 11 pacientů s vaskulární demencí a 32 pacientů s AD pomocí plynové chromatografie a hmotnostní spektrometrie ukázala zvýšení tohoto metabolitu u AD, korelující s výskytem APOE4 alely. Pacienti s mírnou formou nemoci měli 24S-hydroxycholesterol zvýšený oproti kontrolám mírněji, ale odlišnost byla již signifikantní (Papassotiropoulos et al. 2002). To naznačuje, že lipidomické abnormality se vyskytují již v počátečních fázích nemoci. Naše další výzkumná práce by se proto mohla zaměřit na definování změn v lipidomickém profilu v průběhu postupu nemoci, přičemž bychom sledovali specificky jen molekuly, u nichž jsme v aktuální práci detekovali nejvýraznější změny.

### **3.5.5 Ceramidy a sfingomyeliny**

Studie zahrnující 626 mužů a 366 žen starších 55 let analyzovala pomocí kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie hladiny ceramidů a sfingomyelinů v krevní plasmě. Účastníci studie byli dlouhodobě sledováni z hlediska rozvoje AD. U mužů byl pozorován statisticky významný vztah mezi zvýšenou hladinou většiny sfingomyelinů i ceramidů a zvýšeným rizikem AD, zatímco u žen neměly ceramidy žádný vliv a sfingomyeliny v séru predikovaly snížené riziko. Snížení rizika bylo ještě výraznější u nositelů APOE  $\epsilon$ 4 alely. Závěrem této studie je, že problematika vlivu ceramidů a

sfingomyelinů na rozvoj AD má komplexní charakter a při jejím studiu je třeba se zaměřit i na další faktory jako je genetika a pohlaví (Mielke et al. 2017).

#### **3.5.4 Mastné kyseliny**

Nejvíce studovanými MK v souvislosti s neurodegenerativními chorobami jsou polynenasycené mastné kyseliny. Některé z nich jsou známy svou schopností snižovat toxicitu beta amyloidu a zlepšovat schopnost jeho degradace buňkami CNS. In vitro studie ukázala schopnost přímé interakce těchto molekul s beta amyloidem a snížení jeho agregace o 16-84% v závislosti na typu MK. Nejlepší antiagregační účinky na A $\beta$ 40 i A $\beta$ 42 měly kyselina oleová a docosahexaenová (DHA) (El Shatshat, Pham, a Rao 2019). Kyselina linolová a arachidonová navíc zvyšuje schopnost krevního albuminu vázat monomerní beta amyloid, čímž napomáhá jeho odstraňování z tkání ještě před agregací (Litus et al. 2019).

Inkubace potkaních buněk modelujících AD patologii s omega-3 nenasycenými MK in vitro ukázala snížení projevů oxidačního stresu a méně případů apoptózy. Potvrdila tedy neuroprotektivní účinky nenasycených MK (L. Wang et al. 2018).

## 4. Praktická část

Praktická část této práce se zaměřuje na cílenou analýzu lipidomického profilu mozkomíšního moku pacientů s Alzheimerovou nemocí a zjištění odlišností od zdravých kontrol.

Pomocí hmotnostní spektrometrie byly stanoveny hladiny konkrétních skupin lipidových molekul v mozkomíšním moku pacientů s Alzheimerovou nemocí a tyto výsledky byly srovnány s výsledky měření u zdravých kontrol. Následná statistická analýza odhalila statisticky významné odlišnosti mezi oběma skupinami.

Cílená analýza se z hlediska citlivosti měření a rozsahu získaných informací nachází na pomezí sledování jedné látky ve vzorku a necílené analýzy, tedy měření souboru všech typů molekul ve vzorku. Analýza jedné vybrané látky by v našem případě neposkytla dostatečné spektrum údajů a necílená analýza by byla pro naše účely příliš nepřehledná. Proto byly vybrány pouze lipidy a jejich spektrum bylo rozděleno do určitých skupin.

Lipidy byly rozděleny dle chemické příslušnosti do následujících skupin: mastné kyseliny (fatty acids, FA), ceramidy (Cer), hexaglycosylceramidy (HexCer), dihexaglycosylceramidy (Hex2Cer), sfingomyeliny (SM), lyso-fosfatidylcholinu (LPC), lyso-fosfatidylcholinu s alkylovými substituenty (LPC-O), fosfatidylcholinu (PC), fosfatidylcholinu s alkylovými a alkenylovými substituenty (PC-O), fosfatidylethanolaminy (LPE), fosfatidylethanolaminy s alkylovými substituenty (LPE-O), fosfatidylethanolaminy (PE), fosfatidylethanolaminy s alkylovými a alkenylovými substituenty (PE-O), fosfatidylglyceroly (PG), fosfatidylinositoly (PI), fosfatidylseriny (PS), diacylglyceroly (DG), triacylglyceroly (TG), estery cholesterolu (CE).

### 4.1 Hmotnostní spektrometrie jako vhodná metoda

Hmotnostní spektrometrie je metoda analytické chemie sloužící k určování molekulárního složení vzorků (včetně velmi malých objemů) nebo k určení atomového složení molekul. Používá se také k určení chemické struktury peptidů, lipidů a dalších biomolekul. Principem metody je rozdělení různých molekul dle hmotnosti a náboje. Výhodou je, že není potřeba předem definovat složení molekul, které chceme detekovat – analýza zobrazí četnost všech typů molekul. Je tedy možné využít hmotnostní spektrometrii i k objevům dosud neznámých biomolekul.

Složky vzorku jsou v přístroji nejprve odpařeny a ionizovány, například elektronovým paprskem. Poté se rozdělí v analyzátoru elektromagnetického pole podle poměru  $m/Q$ . Poté jsou ionty kvantitativně detekovány, takže lze v reálném čase určit množství různých typů molekul ve vzorku. Výsledky měření jsou poté automaticky počítačově zpracovány. Hmotnostní spektrometr má tři základní moduly: ionizátor, analyzátor elektromagnetického pole a detektor. Detektor je složen ze dvou kovových desek zaznamenávajících dopady iontů (Price 1991).

K širšímu využití k analýze profilů biomolekul (proteomika, lipidomika...) v neurobiologii došlo díky vytvoření šetrných (tzv. měkkých) metod ionizace molekul, např. MALDI (matrix-assisted laser desorption ionization), která působí na vzorek menším množstvím energie než ESI (electrospray ionization). Jednotlivé spektrometry se tedy liší především technikou ionizace (Shariatgorji, Svenningsson, a Andrén 2014).

Hmotnostní spektrometrie je široce využívána ke studiu lipidů v mozku. Pomocí TOF-SIMS zobrazování je možné detekovat přesnou pozici jednotlivých typů molekul v nervové tkáni. Bylo tak například zjištěno, že fosfatidylinositoly, fosfatidylcholin a sulfatidy se vyskytují zejména v šedé hmotě mozkové, zatímco v bílé hmotě převažuje cholesterol a jeho deriváty (Sjövall, Lausmaa, a Johansson 2004).

Metodu lze využít i k citlivému rozlišení chemického složení jednotlivých vrstev kortexu. Na příkladu vizuálního kortexu, dobře prozkoumané oblasti mozku s vysokou konektivitou a hustotou nervových buněk, byla pomocí sledování 123 různých lipidů prokázána možnost rozlišit jednotlivé vrstvy této oblasti kortexu. Tyto vrstvy se výrazně lišily svými lipidomickým složením (González de San Román et al. 2018).

MALDI-MS metoda hmotnostní spektrometrie dokáže detekovat prostorové rozložení lipidových molekul s přesností v řádu nM, TOF-SIMS (time-of-flight) metoda má rozlišení pod 1  $\mu\text{m}$  (Benabdellah et al. 2010).

Pomocí TOF-SIMS spektrometrie byla zjištěna zvýšená hladina cholesterolu v kortexu pacientů s AD (konkrétně ve III a IV vrstvě) a to nezávisle na lokalizaci amyloidových plaků. U všech vzorků byl vyšší výskyt cholesterolu ve vrstvách blíže k bílé hmotě. Pacienti s AD však měli v mozkové kůře o 34% cholesterolu více než zdraví jedinci. Měření tedy nejen potvrdilo zapojení cholesterolu do patogeneze AD, ale i jeho působení nezávisle na molekulách považovaných za hlavní příčinu nemoci (Lazar et al. 2013).

Závěrem těchto výzkumů je, že se hmotnostní spektrometrie je vysoce citlivou metodou schopnou ve vzorcích tkání a tělních tekutin kvantifikovat desítky až stovky různých biomolekul, včetně lipidů, a to v řádu minut. MALDI spektrometrie je vhodná i pro lipidomickou analýzu krevní plasmy nebo likvoru (Stübiger et al. 2009), (Schiller et al. 2007).

## 4.2 Metodika experimentu

Byla aplikována cílená lipidomická metoda podle dříve publikované práce (Xu et al. 2018) LC: kolona s reverzní fází BEH C8 (2,1 mm x 100 mm, 1,7  $\mu$ m, Waters, Milford, MA, USA) byla použita pro chromatografickou separaci lipidů pomocí systému UltiMate 3000 (Dionex Sunnyvale, CA, USA). Mobilní fáze A a B se skládaly z ACN / H<sub>2</sub>O (60:40, obj./obj.) - A IPA / ACN (90:10, obj./obj.) - B. Obě obsahovaly 10 mM AmAc.

Rychlost průtoku byla 0,26 ml / min. Teplota kolony byla 55 ° C. Eluční gradient začal s 32% B a byl udržován po dobu 1,5 minuty, pak lineárně vzrostl na 85% B v 15,5 min, a pak na 97% B v 15,6 min a byl tak udržován po dobu 2,4 min. Gradient se byl vrácen zpět na 32% B v 18,1 min a udržován po dobu 1,9 min, aby se ekvilibrovala kolona. Teplota autosampleru byla nastavena na 10 ° C.

MS: Pro MS detekci byl použit QQQ (MS Triple Quad 6500, výrobce SCIEX, Framingham, MA, USA) MRM MS byl provozován s IonSpray Voltage  $\pm$ 5500/-4500 V v režimu přepínání polarit; teplota byla nastavena na 500 ° C; Ion Source Gas 1 (GS1) a Ion Source Gas 2 (GS2) plyny byly nastaveny na 50 psi.

### 4.2.1 Výběr vzorků

V experimentu byly použity vzorky likvoru pacientů v pokročilejších fázích Alzheimerovy demence (celkem 20 patientských vzorků) a kontrolní vzorky zdravých osob odpovídajícího věku a pohlaví (celkem 19 kontrolních vzorků). Část laboratorních prací byla provedena kolegy ve slovenské laboratoři.

### 4.2.2 Příprava vzorků a postup

Pomocí elektronické pipety bylo odměřeno 40  $\mu$ l likvoru. Bylo přidáno 54  $\mu$ l methyllalkoholu a 266  $\mu$ l MTBE (methyl-t-butylether). Vzorky byly po dobu 1h protřepávány na třepačce. Poté bylo přidáno 80  $\mu$ l destilované vody a vzorky byly dalších 15 min protřepávány. Následně



byly vzorky zcentrifugovány a bylo odebráno 210  $\mu\text{l}$  z horní vrstvy cetrifugátu. Přebytečná voda byla odstraněna lyofilizací (mrazovou sublimací) po dobu 12 h.

Druhý den bylo ke každému vzorku přidáno 50  $\mu\text{l}$  směsi isopropanolu, acetonitrilu a vody v poměru 2:1:1. Z každého takto upraveného vzorku bylo odpipetováno 5  $\mu\text{l}$ , které byly vstříknuty do kapalinového chromatografu RSLC UltiMate 3000. Sledovaná fáze obsahující lipidy pak byla analyzována na tandemovém hmotnostním spektrometru Triple Quad 6500. Spojení kapalinové chromatografie a tandemové hmotnostní spektrometrie se využívá zejména při analýze látek s molekulovou hmotností kolem 15000 Da. Hmotnostní spektrometrii lze využít i bez předchozí separace, výsledky jsou však méně přesné.

#### **4.2.3 Použité přístroje**

Kapalinový chromatograf RSLC UltiMate 3000, výrobce Dionex Sunnyvale, CA, USA.

Hmotnostní spektrometr Triple Quad 6500, výrobce SCIEX, Framingham, MA, USA).

#### **4.2.4 Zpracování výsledků a statistická analýza**

Surová data z analyzátoru hmotnostního spektrometru musejí být zkorigována srovnáním se vzorky kontroly kvality a podrobena komplexním statistickým operacím. Ty zahrnují odstranění specifických chyb měření, nahrazení hodnot pod rozlišovací schopností přístroje, vycentrování dat a jejich škálování na jednotkový rozptyl. Poté je vybrána zobrazovací metoda, která data zpřehlední.

Pokud měření zahrnuje vzájemné srovnávání naměřených hodnot a hledání statisticky významného vztahu (jako v našem případě hledání znaků typických pro příslušnost k patientské nebo kontrolní skupině), je zapotřebí provést testy statistické významnosti.

Nezákladnějším statistickým nástrojem je t-test. Lze jej spolehlivě použít, pokud máme dostatečný počet vzorků a ve výsledcích se nevyskytuje příliš mnoho odlehlých hodnot. V opačném případě je potřeba použít doplňující testy a korekce (např. Benjamin-Hochbergovu korekci). Za hranici statistické významnosti se v literatuře obvykle považuje  $p < 0,05$ .

### 4.3 Výsledky

Skupina pacientů a kontrol se signifikantně ( $p < 0,05$ ) lišila v hodnotách 26 lipidů z celkově 91 měřených, tedy v 28,6%. Rozdíly byly zaznamenány nejvíce v hladinách fosfatidylcholinů a jejich derivátů (22), dále sfingomyelinů (3) a fosfatidyletanolaminu (1). Naopak v hladinách ceramidů, lyso-fosfatidylcholinů, fosfatidylethanolaminů a jejich derivátů nedosáhly pozorované odlišnosti statistické významnosti.

Následující hladiny lipidů se signifikantně lišily (tučně rozdíly se statistickou významností  $p < 0,01$ ):

Tab.2 Fosfatidylcholiny

Vzorek	t-test	Poměr mediánů	Vzorek	t-test	Poměr mediánů
PC 33:1	0,004	1,41	PC 36:0	0,016	1,30
PC 35:2	0,015	1,41	PC 34:3-2	0,047	1,26
PC 31:0	0,027	1,35	PC 32:0	0,013	1,25
PC 32:1	0,030	1,34	PC 34:1	0,015	1,25
PC 40:6	0,009	1,33	PC 40:7	0,020	1,24
PC 36:4	0,029	1,32	PC 36:1	0,024	1,21
PC 37:1	0,048	1,30	PC 35:1	0,029	1,21
PC 34:2	0,049	1,30	PC 38:6	0,018	1,20
			PC 34:0	1,126	0,02

Tab.3 Fosfatidylcholinu s alkylovými a alkenylovými substituenty

Vzorek	t-test	Poměr medianů
PC O-32:1-2	0,044	1,38
PC O-34:0	0,042	1,37
PC O-32:0	0,041	1,35
PC O-33:1-1	0,013	1,34
PC O-31:0	0,028	1,30

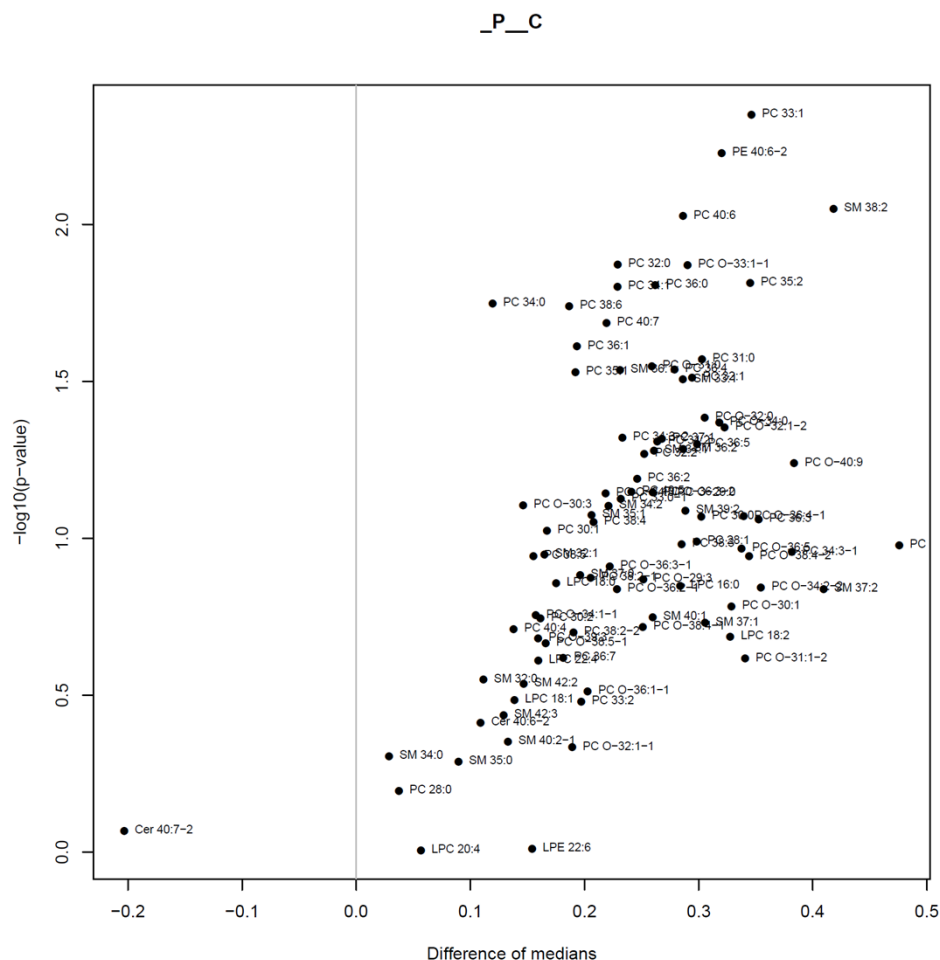
Tab.4 Fosfatidyletanolaminy

Vzorek	t-test	Poměr medianů
PE 40:6-2	0,005	1,37

Tab.5 Sfingomyeliny

Vzorek	t-test	Poměr medianů
SM 38:2	0,009	1,52
SM 33:1	0,031	1,33
SM 36:1	0,029	1,26

Na obrázku 14 je grafické znázornění statistické významnosti jednotlivých rozdílů v průměrných hodnotách hladin lipidů patientské a kontrolní skupině. Na vodorovné ose je rozdíl průměrných hodnot v obou skupinách. U všech sledovaných lipidů kromě ceramidu Cer 40:7-2 byla hladina vyšší v patientské skupině. Na svislé ose je statistická významnost (v logaritmickém měřítku). 26 sledovaných lipidů z různých skupin se statisticky významně lišilo ( $p < 0,05$ ), další se hladině významnosti blížily.

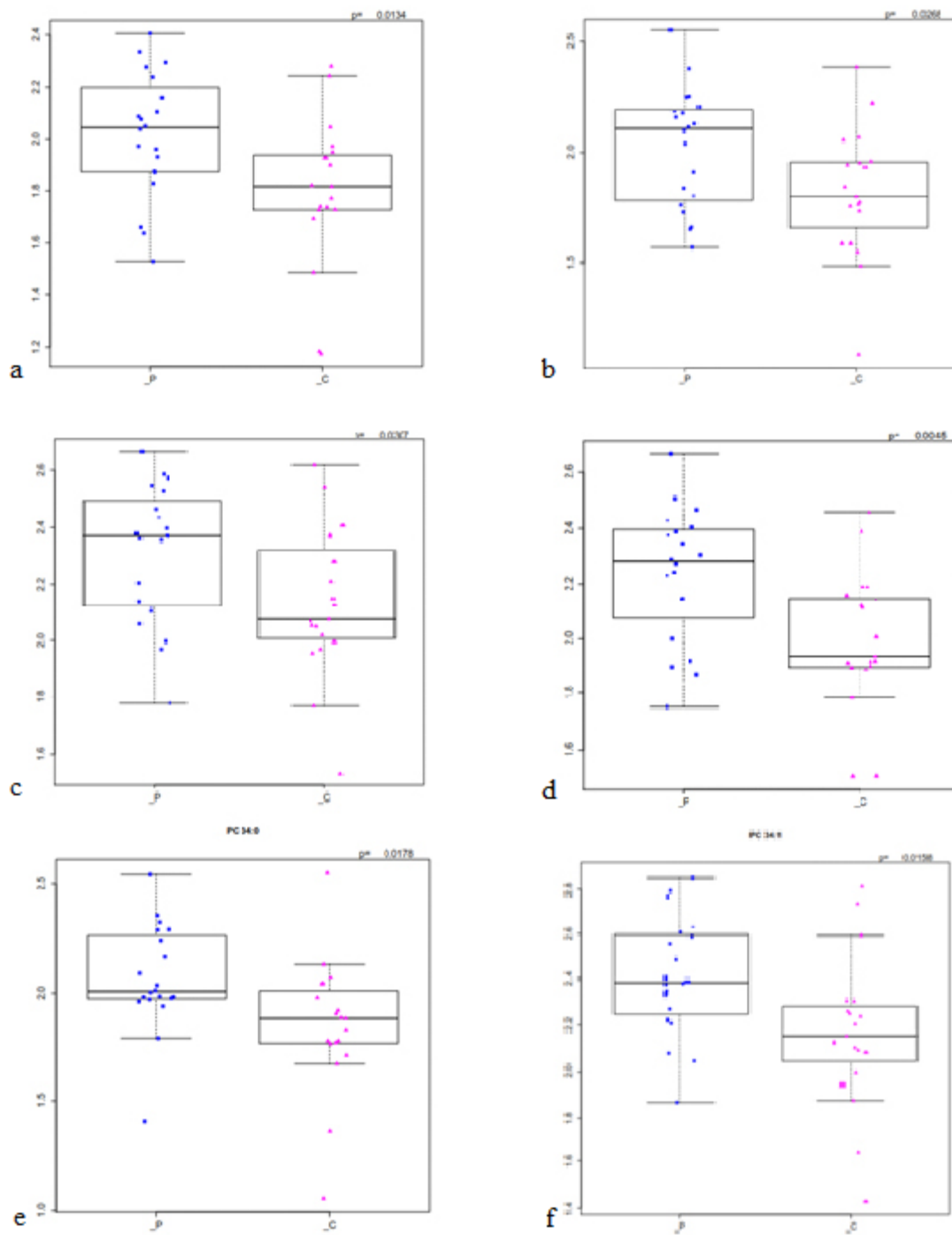


Obr.14: grafické znázornění statistické významnosti jednotlivých rozdílů v průměrných hodnotách hladin lipidů patientské a kontrolní skupině

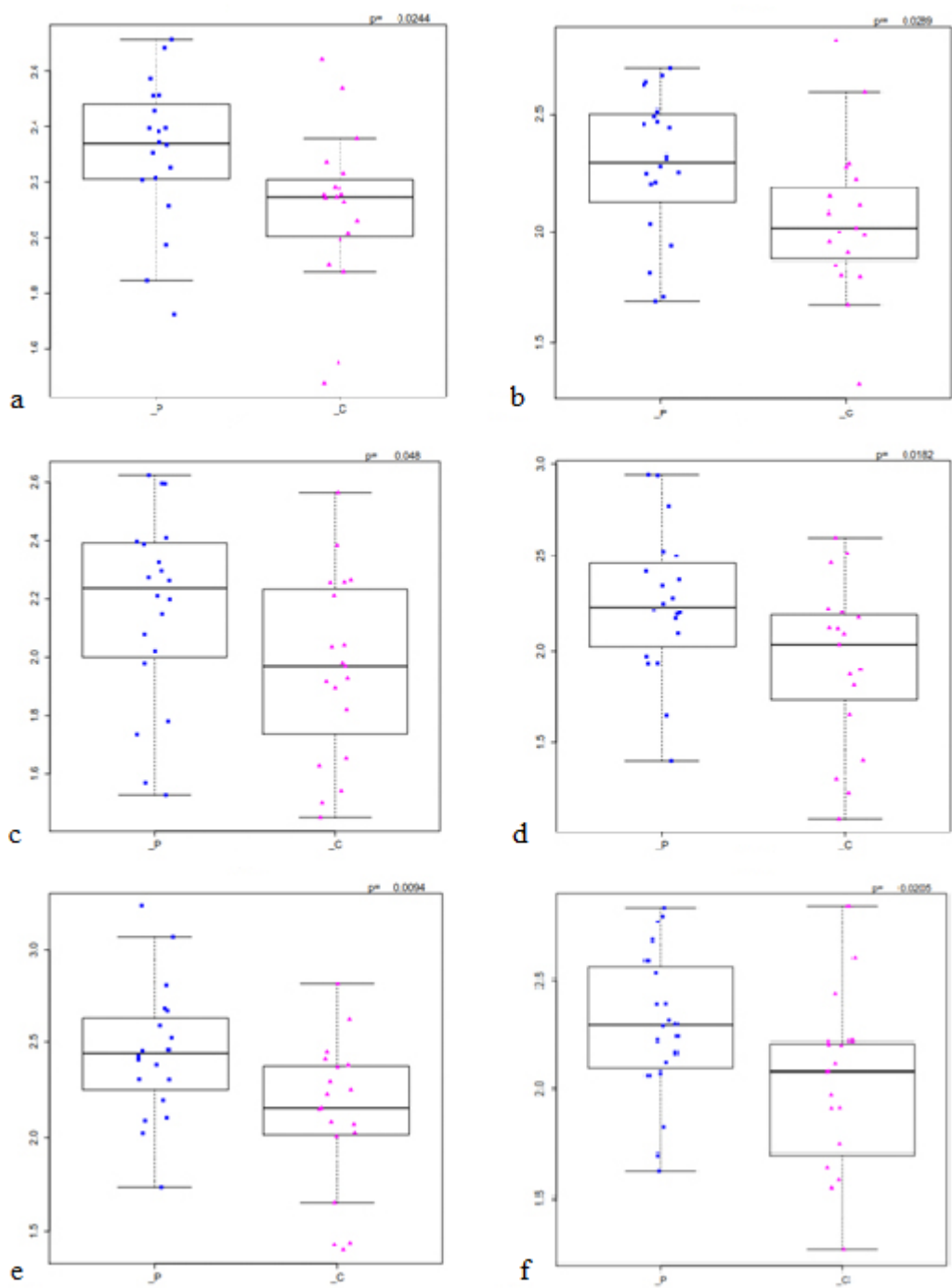
### Grafické znázornění výsledků měření

V následujících 26 grafech jsou znázorněny hodnoty všech měření lipidů, jejichž rozdíl mezi oběma skupinami byl statisticky významný. Nad každým grafem je uvedena příslušná zkratka lipidu, kterého se měření týkalo. V pravém horním rohu je uvedena statistická významnost. Levý sloupec (modré čtverečky) odpovídá jednotlivým vzorkům patientské skupiny, pravý sloupec (růžové trojúhelníky) odpovídá měřením kontrolních vzorků zdravých osob. U všech drafů je viditelný také rozptyl a střední hodnoty. Na svislé ose jsou jednotky měření v ( $\mu\text{mol/ml}$ ).

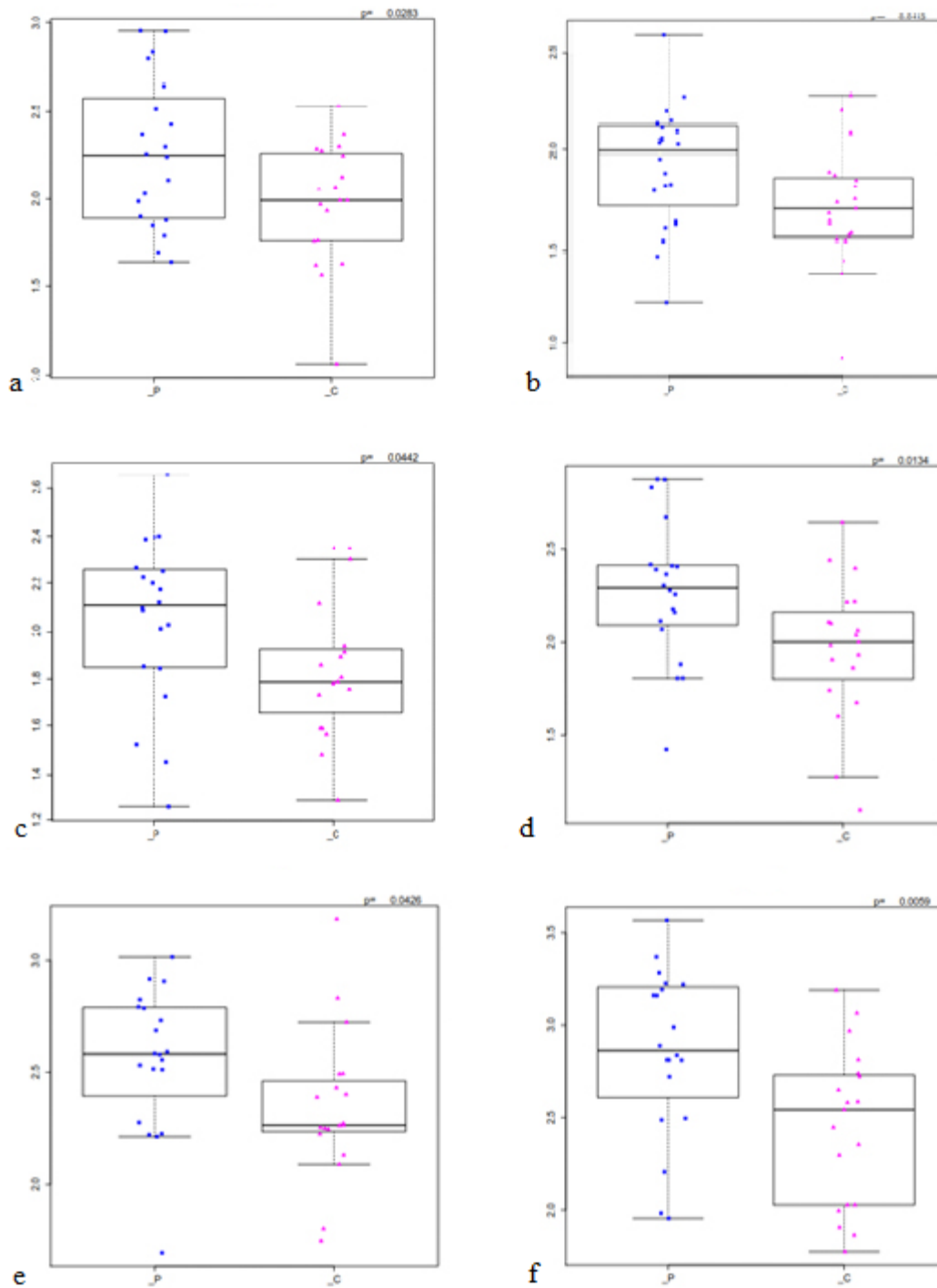
Všechny měřené lipidy, které dosáhly hladiny statistické významnosti, byly zvýšené v patientské skupině, což odpovídá informacím z literatury o hypercholesterémii a hyperlipidémii jako rizikových faktorech AD.



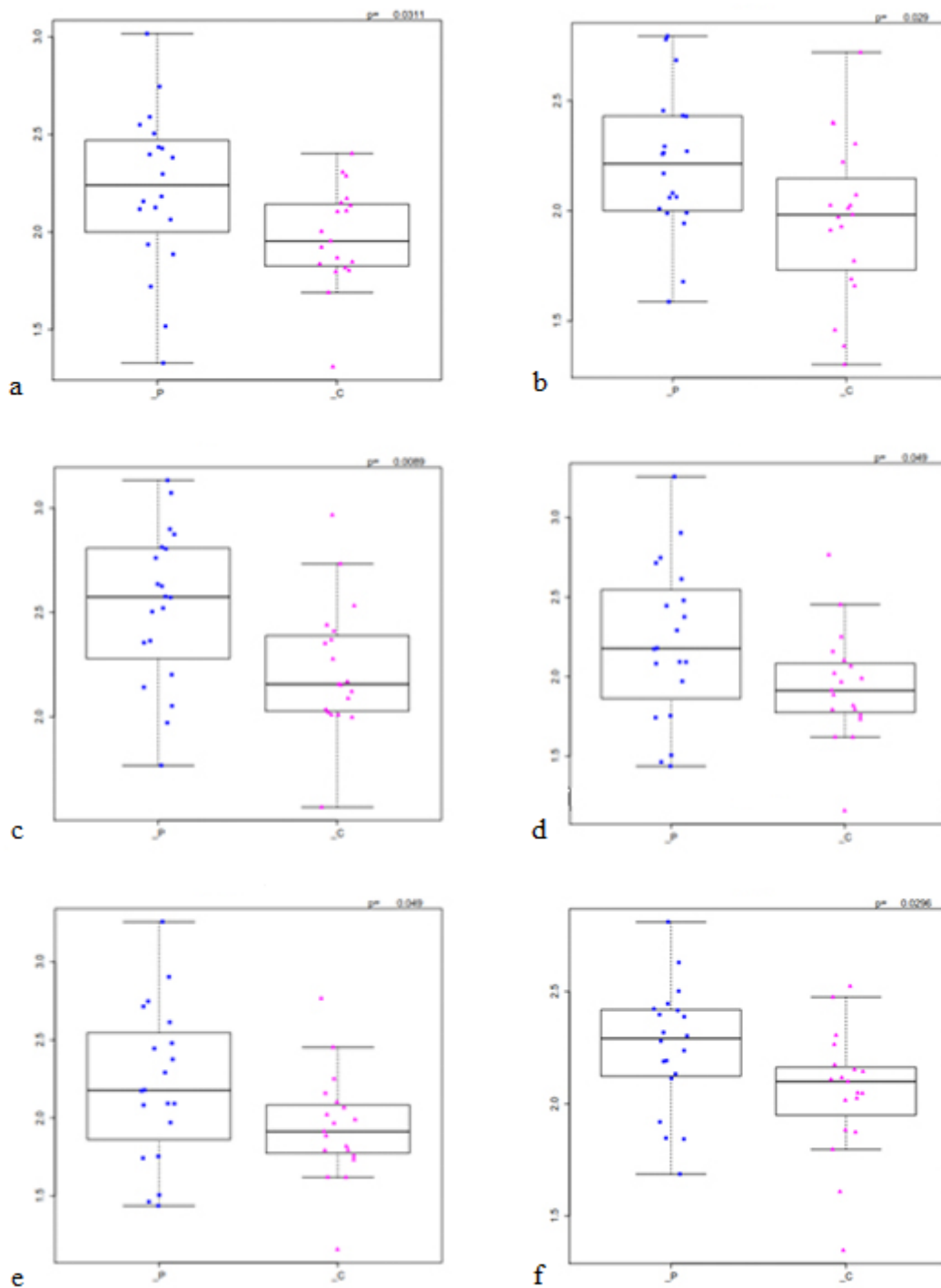
Obr.15: Krabicový graf měření lipidů: a - PC 32:0 ( $p=0,0134$ ); b- PC 31:0 ( $p=0,0268$ ); c - PC 32:1 ( $p=0,0307$ ); d - PC 33:1( $p=0,045$ ); e - PC 34:0 ( $p=0,0178$ ); f - PC 34:1 ( $p=0,0158$ )



Obr.16: Krabicový graf měření lipidů a - PC 36:1 ( $p=0,0244$ ); b - PC 36:4 ( $p=0,0289$ ); c - PC 37:1( $p=0,048$ ); d - PC 38:6( $p=0,0182$ ); e - PC 40:6( $p=0,094$ ); f - PC 40:7( $p=0,0205$ )

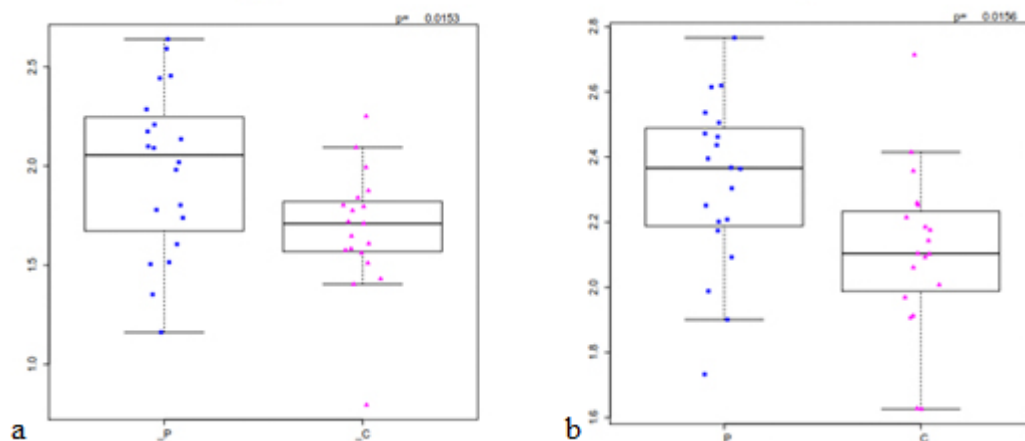


Obr.17: Krabicový graf měření lipidů a - PC O - 31:0(p=0,0283); b - PC O - 32:0(p=0,0412); c - PC O - 32:1-2(p=0,0442); d - PC O - 33:1-1(p=0,0134); e - PC O - 34:0(p=0,0426); f - PE 40:6-2 (p=0,0059);



Obr.18: Krabicový graf měření lipidů a - PC 35:1(p=0.0296); b - PC 34:3-2(p=0.0478); c - PC 34:2(p=0.049); d - SM 33:1(p=0.0311); e - SM 36:1 (p=0.029); f - SM 38:2 (p=0.0089)





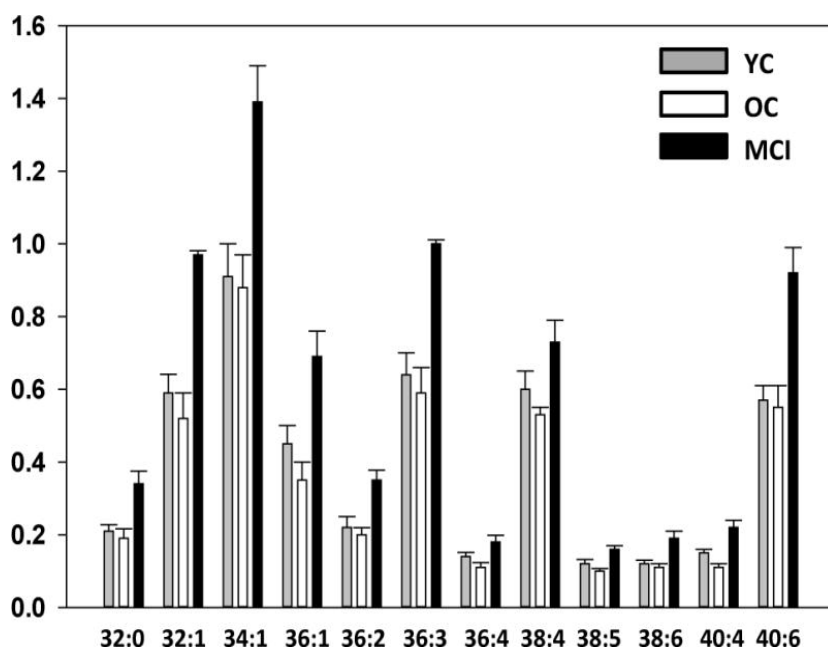
Obr.19: Krabicový graf měření lipidů a - PC 35:2 ( $p=0,0153$ ); b - PC 36:0 ( $p=0,0156$ )

#### 4.4. Diskuse

Výsledky našich měření potvrzují nejnovější poznatky v literatuře. Bylo zjištěno, že zkoumaná skupina pacientů se v hladinách 28% zkoumaných lipidů signifikantně liší od kontrolní skupiny zdravých dobrovolníků. Kromě výše zmiňovaných lipidů se i další hodnoty blížily hranici statistické významnosti a pro přesnější určení jejich vlivu by bylo zapotřebí dalších měření. Nezjištění statisticky významné odlišnosti (falešná negativita) může být v daném případě způsobeno nedostatečným počtem měření a výskytem odlehlých hodnot, s nimiž je v biomedicinském výzkumu nutné počítat.

Všechny statisticky významné výsledky znamenaly zvýšení hladiny lipidů v patientské skupině. To je v souladu s literaturou, například studie 19 patientských a 28 kontrolních vzorků frontálního kortexu (post mortem) ukázala také zvýšení všech hodnot měřených lipidů (v tomto případě diacylglycerolů) (obr. 41). U monoacylglycerolů byly rozdíly ještě výraznější. Měření probíhalo také pomocí hmotnostní spektrometrie, a to metodou ESI (Wood et al. 2015).

Na obrázku 41 vidíme 3 druhy sloupce. Šedé sloupce značí kontrolní vzorky kortexu mladých osob, bílé starších osob a černé starších osob s mírnou formou demence. U všech DAG došlo byly nejvyšší hodnoty naměřeny v patientské skupině. Zdroj: (Wood et al. 2015).



Obr.19: Výsledky srovnatelné lipidomické analýzy, zaměřené na diacylglyceroly s různými MK

V naší práci vyšlo statisticky nejvýznamnější zvýšení u sfingomyelinu SM 38:2, Fosfatidyletanolaminu PE 40:6–2 a fosfatidylcholinů PC 33:1 a PC 40:6, přičemž zvýšení hladiny některých sfingomyelinů a fosfatidylcholinů je v literatuře popsáno jako pozitivně korelující s tíží symptomů AD (Varma et al. 2018).

Studie prováděná na 100 vzorcích (50 AD, 50 kontrol) prokázala zvýšení SM 18:1/18:0 a SM 18:1/18:1 (v naší studii bylo zvýšení pod hranicí statistické významnosti), a 5 glycerophospholipidů PC 32:0, PC 34:1, C36:1, PC 38:4 a PC 38:6) v mozkomíšním moku pacientů s AD (pozitivní klasické biomarkery tau a beta amyloid, klinické projevy demence) (Koal et al. 2015). Kromě PC 38:4, u něhož bylo zvýšení pod hranicí statistické významnosti, se naše zjištění ohledně glycerophospholipidů s publikovanou prací shodují.

Výsledky našich měření tedy odpovídají současným poznatkům o lipidomických změnách u AD. Celkovým trendem je zvýšení hladiny různých lipidů v patientské skupině, podařilo se zaznamenat signifikantní zvýšení i u konkrétních sfingomyelinů a glycerophospholipidů popsaných již dříve v literatuře. Celkově málo se ví o změnách konkrétních fosfatidyletanolaminů v mozkomíšním moku. Vzhledem k zásadní funkci těchto lipidů v tvorbě membrán může jejich studium u AD přinést zajímavé poznatky. Vzhledem k nejednoznačnosti současných znalostí zatím nemůžeme fosfatidyletanolaminy využít jako

alternativní biomarkery – z naší studie vychází jako vhodnější kandidáti spíše některé glycerophospholipidy a sfingomyeliny, orientačně také celkové zvýšení lipidů v CSF.

Mezi jednotlivými studii publikovanými v odborných časopisech jsou drobné odchylky způsobené zejména komplexností lidského lipidomu, kdy počet měření vzorků k dosažení statistické shody výrazně převyšuje možnosti. Existenci změn v lipidomu, směrem ke zvýšení hladin většiny lipidů u pacientů, kterou jsme popsali v naší práci, lze považovat za dostatečně prokázanou.

## 5. Závěr

Cílem této práce bylo přehledně shrnout neuropatologické a biochemické změny u pacientů s tauopatií, se zaměřením na změny lipidomického profilu a navržení citlivějších biomarkerů než jsou hladiny tau proteinu a beta amyloidu (které jsou většinou detekovatelné až v pozdějších fázích nemoci). Popsali jsme mechanismy rozvoje nemoci a dosud publikované způsoby, jak k patofyziologii může přispívat narušení lipidomické rovnováhy. Poruchy transportu lipidů, jejich zvýšený obsah v neuronech i likvoru, hypercholesterémie a molekulární změny membrán neuronů byly popsány u pacientů s AD. Změny struktury membrán a složení membránových proteinů (např. sekretáz) mohou vést k zvýšené tvorbě a hromadění defektních proteinů. Lipidy zároveň interagují s imunitním systémem a jejich patologické zvýšení zvyšuje riziko zánětu, vedoucího k dalším změnám v mozkové tkáni.

V praktické části byly pomocí hmotnostní spektrometrie měřeny hladiny 91 lipidů různých chemických tříd v likvoru celkem 20 pacientů a 19 kontrol. Signifikantní zvýšení, v souladu s dosud publikovanými poznatky, bylo naměřeno u některých sfingomyelinů a glycerophospholipidů. Celkem se významně lišilo 28,6% měřených lipidů, a také celková hladina lipidů v CSF.

Výsledkem práce je potvrzení dosavadních poznatků, včetně vhodnosti lipidomických odlišností coby nového klinického biomarkeru časných stadií AD. Konkrétními molekulami pro klinickou diagnostiku by mohly být vybrané sfingomyeliny a glycerophospholipidy. Pro tento účel by bylo vhodné provést analýzu zaměřenou pouze na změny konkrétní vybrané molekuly v závislosti na čase a tíži symptomatiky AD.

Role fosfatidylethanolaminů u neurodegenerativních onemocnění je pravděpodobně velmi významná, otázka její zkoumatelnosti pomocí měření hladin PE v likvoru je však diskutabilní. Vztah v tomto případě nemusí být jen lineární zvýšení nebo snížení, ačkoli naše měření signifikantní zvýšení jednoho z PE odhalilo.

## Zdroje

Alonso, A., T. Zaidi, M. Novak, I. Grundke-Iqbal, a K. Iqbal. 2001. „Hyperphosphorylation Induces Self-Assembly of Tau into Tangles of Paired Helical Filaments/Straight Filaments". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (12): 6923–28. <https://doi.org/10.1073/pnas.121119298>.

Alves, Guido, Kolbjørn Brønnick, Dag Aarsland, Kaj Blennow, Henrik Zetterberg, Clive Ballard, Martin Wilhelm Kurz, et al. 2010. „CSF Amyloid-Beta and Tau Proteins, and Cognitive Performance, in Early and Untreated Parkinson's Disease: The Norwegian ParkWest Study". *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry* 81 (10): 1080–86. <https://doi.org/10.1136/jnnp.2009.199950>.

Alzheimer's Association. 2015. „2015 Alzheimer's Disease Facts and Figures". *Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association* 11 (3): 332–84.

Alzheimer's Association. 2016. „2016 Alzheimer's Disease Facts and Figures". *Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association* 12 (4): 459–509.

Araki, Wataru, a Akira Tamaoka. 2015. „Amyloid Beta-Protein and Lipid Rafts: Focused on Biogenesis and Catabolism". *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)* 20 (leden): 314–24.

Benabdellah, Farida, Alexandre Seyer, Loïc Quinton, David Touboul, Alain Brunelle, a Olivier Laprévotte. 2010. „Mass Spectrometry Imaging of Rat Brain Sections: Nanomolar Sensitivity with MALDI versus Nanometer Resolution by TOF-SIMS". *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 396 (1): 151–62. <https://doi.org/10.1007/s00216-009-3031-2>.

Blasco, H., C. Veyrat-Durebex, C. Bocca, F. Patin, P. Vourc'h, J. Kouassi Nzougnet, G. Lenaers, et al. 2017. „Lipidomics Reveals Cerebrospinal-Fluid Signatures of ALS". *Scientific Reports* 7 (prosinec). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17389-9>.

Bosetti, Francesca, Francesca Brizzi, Silvia Barogi, Michelangelo Mancuso, Gabriele Siciliano, Elisabetta A. Tendi, Luigi Murri, Stanley I. Rapoport, a Giancarlo Solaini. 2002. „Cytochrome c Oxidase and Mitochondrial F1F0-ATPase (ATP Synthase) Activities in Platelets and Brain from Patients with Alzheimer's Disease". *Neurobiology of Aging* 23 (3): 371–76.

Di Fede, Giuseppe, Marcella Catania, Michela Morbin, Giorgio Giaccone, Maria Luisa Moro, Roberta Ghidoni, Laura Colombo, et al. 2012. „Good Gene, Bad Gene: New APP Variant

May Be Both". *Progress in Neurobiology* 99 (3): 281–92.  
<https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2012.06.004>.

Di Fede, Giuseppe, Marcella Catania, Michela Morbin, Giacomina Rossi, Silvia Suardi, Giulia Mazzoleni, Marco Merlin, et al. 2009. „A Recessive Mutation in the APP Gene with Dominant-Negative Effect on Amyloidogenesis". *Science (New York, N.Y.)* 323 (5920): 1473–77. <https://doi.org/10.1126/science.1168979>.

El Shatshat, Amna, Amy Trinh Pham, a Praveen P. N. Rao. 2019. „Interactions of Polyunsaturated Fatty Acids with Amyloid Peptides A $\beta$ 40 and A $\beta$ 42". *Archives of Biochemistry and Biophysics* 663 (březen): 34–43.  
<https://doi.org/10.1016/j.abb.2018.12.027>.

Fedeli, Chiara, Riccardo Filadi, Alice Rossi, Cristina Mammucari, a Paola Pizzo. 2019. „PSEN2 (Presenilin 2) Mutants Linked to Familial Alzheimer Disease Impair Autophagy by Altering Ca<sup>2+</sup> Homeostasis". *Autophagy*, březen, 1–19.  
<https://doi.org/10.1080/15548627.2019.1596489>.

Fernandez, A. M., A. Santi, a I. Torres Aleman. 2018. „Insulin Peptides as Mediators of the Impact of Life Style in Alzheimer’s Disease". *Brain Plasticity (Amsterdam, Netherlands)* 4 (1): 3–15. <https://doi.org/10.3233/BPL-180071>.

Fiala, Milan, a Robert Veerhuis. 2010. „Biomarkers of inflammation and amyloid- $\beta$  phagocytosis in patients at risk of Alzheimer disease". *Experimental gerontology* 45 (1): 57–63. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2009.08.003>.

Fonteh, Alfred N., Robert J. Harrington, Andreas F. Huhmer, Roger G. Biringer, James N. Riggins, a Michael G. Harrington. 2006. „Identification of Disease Markers in Human Cerebrospinal Fluid Using Lipidomic and Proteomic Methods". *Disease Markers* 22 (1–2): 39–64. <https://doi.org/10.1155/2006/202938>.

González de San Román, Estibaliz, Hans-Jürgen Bidmon, Milena Malisic, Iuliana Susnea, Astrid Küppers, Rene Hübbers, Andreas Wree, Volker Nischwitz, Katrin Amunts, a Pitter F. Huesgen. 2018. „Molecular composition of the human primary visual cortex profiled by multimodal mass spectrometry imaging". *Brain Structure & Function* 223 (6): 2767–83.  
<https://doi.org/10.1007/s00429-018-1660-y>.

Harada, A., K. Oguchi, S. Okabe, J. Kuno, S. Terada, T. Ohshima, R. Sato-Yoshitake, Y. Takei, T. Noda, a N. Hirokawa. 1994. „Altered Microtubule Organization in Small-Calibre

Axons of Mice Lacking Tau Protein". *Nature* 369 (6480): 488–91. <https://doi.org/10.1038/369488a0>.

Hardy, John. 2017. „The Discovery of Alzheimer-Causing Mutations in the APP Gene and the Formulation of the ‚Amyloid Cascade Hypothesis‘". *The FEBS Journal* 284 (7): 1040–44. <https://doi.org/10.1111/febs.14004>.

Holmes, C. 2013. „Review: Systemic Inflammation and Alzheimer’s Disease". *Neuropathology and Applied Neurobiology* 39 (1): 51–68. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2990.2012.01307.x>.

Chang, Ta-Yuan, Yoshio Yamauchi, Mazahir T. Hasan, a Catherine Chang. 2017. „Cellular Cholesterol Homeostasis and Alzheimer’s Disease". *Journal of Lipid Research* 58 (12): 2239–54. <https://doi.org/10.1194/jlr.R075630>.

Chaunu, Marie-Pierre, Vincent Deramecourt, Valérie Buée-Scherrer, Isabelle Le Ber, Alexis Brice, Nathalie Ehrle, Khalid El Hachimi, et al. 2013. „Juvenile Frontotemporal Dementia with Parkinsonism Associated with Tau Mutation G389R". *Journal of Alzheimer’s Disease: JAD* 37 (4): 769–76. <https://doi.org/10.3233/JAD-130413>.

Chen, Guo-fang, Ting-hai Xu, Yan Yan, Yu-ren Zhou, Yi Jiang, Karsten Melcher, a H. Eric Xu. 2017. „Amyloid Beta: Structure, Biology and Structure-Based Therapeutic Development". *Acta Pharmacologica Sinica* 38 (9): 1205–35. <https://doi.org/10.1038/aps.2017.28>.

Choi, Se Hoon, Young Hye Kim, Matthias Hebisch, Christopher Sliwinski, Seungkyu Lee, Carla D’Avanzo, Hechao Chen, et al. 2014. „A Three-Dimensional Human Neural Cell Culture Model of Alzheimer’s Disease". *Nature* 515 (7526): 274–78. <https://doi.org/10.1038/nature13800>.

Ihara, Yasuo, Maho Morishima-Kawashima, a Ralph Nixon. 2012. „The Ubiquitin–Proteasome System and the Autophagic–Lysosomal System in Alzheimer Disease". *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 2 (8). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006361>.

Jouanne, Marie, Sylvain Rault, a Anne-Sophie Voisin-Chiret. 2017. „Tau Protein Aggregation in Alzheimer’s Disease: An Attractive Target for the Development of Novel Therapeutic Agents". *European Journal of Medicinal Chemistry* 139 (řijen): 153–67. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.07.070>.

Karlíková, Radana, Kateřina Mičová, Lukáš Najdekr, Alžběta Gardlo, Tomáš Adam, Petra Majerová, David Friedecký, a Andrej Kováč. 2017. „Metabolic Status of CSF Distinguishes Rats with Tauopathy from Controls". *Alzheimer's Research & Therapy* 9 (1): 78. <https://doi.org/10.1186/s13195-017-0303-5>.

Kaushal, Alka, Willayat Yousuf Wani, Amanjit Bal, Kiran Dip Gill, a Jyotdeep Kaur. 2019. „Okadaic Acid and Hypoxia Induced Dementia Model of Alzheimer's Type in Rats". *Neurotoxicity Research* 35 (3): 621–34. <https://doi.org/10.1007/s12640-019-0005-9>.

Kawamata, Hibiki, a Giovanni Manfredi. 2017. „Proteinopathies and OXPHOS Dysfunction in Neurodegenerative Diseases". *The Journal of Cell Biology* 216 (12): 3917–29. <https://doi.org/10.1083/jcb.201709172>.

Kelleher, Raymond J., a Jie Shen. 2017. „Presenilin-1 Mutations and Alzheimer's Disease". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114 (4): 629–31. <https://doi.org/10.1073/pnas.1619574114>.

Koal, Therese, Kristaps Klavins, Daniele Seppi, Georg Kemmler, a Christian Humpel. 2015. „Sphingomyelin SM(D18:1/18:0) Is Significantly Enhanced in Cerebrospinal Fluid Samples Dichotomized by Pathological Amyloid-B42, Tau, and Phospho-Tau-181 Levels". *Journal of Alzheimer's Disease: JAD* 44 (4): 1193–1201. <https://doi.org/10.3233/JAD-142319>.

Kolarova, Michala, Francisco García-Sierra, Ales Bartos, Jan Ricny, a Daniela Ripova. 2012. „Structure and Pathology of Tau Protein in Alzheimer Disease". *International Journal of Alzheimer's Disease* 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/731526>.

Kovacs, Gabor G. 2017. „Tauopathies". *Handbook of Clinical Neurology* 145: 355–68. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802395-2.00025-0>.

Křištofiková, Zdena, Zdeněk Kříž, Daniela Řipová, a Jaroslav Koča. 2012. „Interactions of Amyloid  $\beta$  Peptide 1-40 and Cerebrosterol". *Neurochemical Research* 37 (3): 604–13. <https://doi.org/10.1007/s11064-011-0650-8>.

Kumar, Rajnish, Agneta Nordberg, a Taher Darreh-Shori. 2016. „Amyloid- $\beta$  peptides act as allosteric modulators of cholinergic signalling through formation of soluble BA $\beta$ ACs". *Brain* 139 (1): 174–92. <https://doi.org/10.1093/brain/awv318>.

Lazar, Adina N., Claudia Bich, Maï Panchal, Nicolas Desbenoit, Vanessa W. Petit, David Touboul, Luce Dauphinot, et al. 2013. „Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry (TOF-SIMS) Imaging Reveals Cholesterol Overload in the Cerebral Cortex of Alzheimer



Disease Patients". *Acta Neuropathologica* 125 (1): 133–44. <https://doi.org/10.1007/s00401-012-1041-1>.

Leoni, Valerio, Alina Solomon, Anita Lövgren-Sandblom, Lennart Minthon, Kaj Blennow, Oskar Hansson, Lars-Olof Wahlund, Miia Kivipelto, a Ingemar Björkhem. 2013. „Diagnostic Power of 24S-Hydroxycholesterol in Cerebrospinal Fluid: Candidate Marker of Brain Health". *Journal of Alzheimer's Disease: JAD* 36 (4): 739–47. <https://doi.org/10.3233/JAD-130035>.

Li, Ge, Cynthia L. Mayer, Daniel Morelli, Steven P. Millard, Wendy H. Raskind, Eric C. Petrie, Monique Cherrier, Anne M. Fagan, Murray A. Raskind, a Elaine R. Peskind. 2017. „Effect of Simvastatin on CSF Alzheimer Disease Biomarkers in Cognitively Normal Adults". *Neurology* 89 (12): 1251–55. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000004392>.

Li, Qian, Yi Liu, a Miao Sun. 2017. „Autophagy and Alzheimer's Disease". *Cellular and Molecular Neurobiology* 37 (3): 377–88. <https://doi.org/10.1007/s10571-016-0386-8>.

Liguori, Claudio, Enrica Olivola, Mariangela Pierantozzi, Rocco Cerroni, Salvatore Galati, Valentina Saviozzi, Nicola Biagio Mercuri, a Alessandro Stefani. 2017. „Cerebrospinal-Fluid Alzheimer's Disease Biomarkers and Blood-Brain Barrier Integrity in a Natural Population of Cognitive Intact Parkinson's Disease Patients". *CNS & Neurological Disorders Drug Targets* 16 (3): 339–45. <https://doi.org/10.2174/1871527316666161205123123>.

Litus, E. A., A. S. Kazakov, A. S. Sokolov, E. L. Nemashkalova, E. I. Galushko, U. F. Dzhus, V. V. Marchenkov, O. V. Galzitskaya, E. A. Permyakov, a S. E. Permyakov. 2019. „The Binding of Monomeric Amyloid  $\beta$  Peptide to Serum Albumin Is Affected by Major Plasma Unsaturated Fatty Acids". *Biochemical and Biophysical Research Communications* 510 (2): 248–53. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.01.081>.

Liu, Chia-Chen, Takahisa Kanekiyo, Huaxi Xu, a Guojun Bu. 2013. „Apolipoprotein E and Alzheimer disease: risk, mechanisms, and therapy". *Nature reviews. Neurology* 9 (2): 106–18. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2012.263>.

Lizard, Gérard, Olivier Rouaud, Jean Demarquoy, Mustapha Cherkaoui-Malki, a Luigi Iuliano. 2012. „Potential Roles of Peroxisomes in Alzheimer's Disease and in Dementia of the Alzheimer's Type". *Journal of Alzheimer's Disease: JAD* 29 (2): 241–54. <https://doi.org/10.3233/JAD-2011-111163>.

LoBue, Christian, Hannah Wadsworth, Kristin Wilmoth, Matthew Clem, John Hart, Kyle B. Womack, Nyaz Didehbani, Laura H. Lacritz, Heidi C. Rossetti, a C. Munro Cullum. 2017.

„Traumatic Brain Injury History Is Associated with Earlier Age of Onset of Alzheimer Disease". *The Clinical Neuropsychologist* 31 (1): 85–98. <https://doi.org/10.1080/13854046.2016.1257069>.

Loera-Valencia, Raúl, Julen Goikolea, Cristina Parrado-Fernandez, Paula Merino-Serrais, a Silvia Maioli. 2019. „Alterations in Cholesterol Metabolism as a Risk Factor for Developing Alzheimer’s Disease: Potential Novel Targets for Treatment". *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, březen. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2019.03.003>.

Luengo, Enrique, Izaskun Buendia, Cristina Fernández-Mendivil, P. Trigo-Alonso, Pilar Negrodo, Patrycja Michalska, Borja Hernández-García, et al. 2019. „Pharmacological Doses of Melatonin Impedes Cognitive Decline in Tau-Related Alzheimer Models, Once Tauopathy Is Initiated, by Restoring the Autophagic Flux". *Journal of Pineal Research*, duben, e12578. <https://doi.org/10.1111/jpi.12578>.

Mielke, Michelle M., Norman J. Haughey, Dingfen Han, Yang An, Veera Venkata Ratnam Bandaru, Constantine G. Lyketsos, Luigi Ferrucci, a Susan M. Resnick. 2017. „The Association Between Plasma Ceramides and Sphingomyelins and Risk of Alzheimer’s Disease Differs by Sex and APOE in the Baltimore Longitudinal Study of Aging". *Journal of Alzheimer’s Disease: JAD* 60 (3): 819–28. <https://doi.org/10.3233/JAD-160925>.

Nagata, Kenichi, Mika Takahashi, Yukio Matsuba, Fumi Okuyama-Uchimura, Kaori Sato, Shoko Hashimoto, Takashi Saito, a Takaomi C. Saido. 2018. „Generation of App Knock-in Mice Reveals Deletion Mutations Protective against Alzheimer’s Disease-like Pathology". *Nature Communications* 9 (1): 1800. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04238-0>.

Orange, Marie d’, Gwénaelle Aurégan, Dimitri Cheramy, Mylène Gaudin-Guérif, Sarah Lieger, Martine Guillermier, Lev Stimmer, et al. 2018. „Potentiating tangle formation reduces acute toxicity of soluble tau species in the rat". *Brain* 141 (2): 535–49. <https://doi.org/10.1093/brain/awx342>.

Papassotiropoulos, A., D. Lütjohann, M. Bagli, S. Locatelli, F. Jessen, R. Buschfort, U. Ptok, I. Björkhem, K. von Bergmann, a R. Heun. 2002. „24S-Hydroxycholesterol in Cerebrospinal Fluid Is Elevated in Early Stages of Dementia". *Journal of Psychiatric Research* 36 (1): 27–32.

Pir, Ghulam Jeelani, Bikash Choudhary, a Eckhard Mandelkow. 2017. „Caenorhabditis Elegans Models of Tauopathy". *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of*

American Societies for Experimental Biology 31 (12): 5137–48.  
<https://doi.org/10.1096/fj.201701007>.

Price, Phil. 1991. „Standard Definitions of Terms Relating to Mass Spectrometry". *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 2 (4): 336–48. [https://doi.org/10.1016/1044-0305\(91\)80025-3](https://doi.org/10.1016/1044-0305(91)80025-3).

Prüßing, Katja, Aaron Voigt, a Jörg B. Schulz. 2013. „Drosophila Melanogaster as a Model Organism for Alzheimer's Disease". *Molecular Neurodegeneration* 8 (listopad): 35. <https://doi.org/10.1186/1750-1326-8-35>.

Reijs, Babette L. R., Stephanie J. B. Vos, Hilka Soininen, Jyrki Lötjonen, Juha Koikkalainen, Maria Pikkarainen, Anette Hall, et al. 2017. „Association Between Later Life Lifestyle Factors and Alzheimer's Disease Biomarkers in Non-Demented Individuals: A Longitudinal Descriptive Cohort Study". *Journal of Alzheimer's Disease: JAD* 60 (4): 1387–95. <https://doi.org/10.3233/JAD-170039>.

Reilly, Patrick, Charisse N. Winston, Kelsey Baron, Margarita Trejo, Edward M. Rockenstein, Johnny C. Akers, Najla Kfoury, et al. 2017. „Novel human neuronal tau model exhibiting neurofibrillary tangles and transcellular propagation". *Neurobiology of disease* 106 (říjen): 222–34. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2017.06.005>.

Ribbe, Mats, Silke Kern, Anne Börjesson Hansson, Svante Östling, Henrik Zetterberg, Kaj Blennow, a Ingmar Skoog. 2019. „Amyloid B42 and Total Tau Levels in Cerebrospinal Fluid Associate with Survival in an 85-Year-Old Population-Based Cohort Followed until Death". *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders* 47 (1–2): 114–23. <https://doi.org/10.1159/000499066>.

Robert, Jérôme, Sophie Stukas, Emily Button, Wai Hang Cheng, Michael Lee, Jianjia Fan, Anna Wilkinson, Iva Kulic, Samuel D. Wright, a Cheryl L. Wellington. 2016. „Reconstituted High-Density Lipoproteins Acutely Reduce Soluble Brain A $\beta$  Levels in Symptomatic APP/PS1 Mice". *Biochimica Et Biophysica Acta* 1862 (5): 1027–36. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2015.10.005>.

Rossi Dare, Leticia, Alexandre Garcia, Nieve Alves, Daniel Ventura Dias, Mauren Assis de Souza, a Pâmela B. Mello-Carpes. 2019. „Physical and Cognitive Training Are Able to Prevent Recognition Memory Deficits Related to Amyloid Beta Neurotoxicity". *Behavioural Brain Research* 365 (červen): 190–97. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.03.007>.

Russ, Tom C., Lewis O. J. Killin, Jean Hannah, G. David Batty, Ian J. Deary, a John M. Starr. 2019. „Aluminium and Fluoride in Drinking Water in Relation to Later Dementia Risk". *The British Journal of Psychiatry: The Journal of Mental Science*, březen, 1–6. <https://doi.org/10.1192/bjp.2018.287>.

Saura, Carlos A., Se-Young Choi, Vassilios Beglopoulos, Seema Malkani, Dawei Zhang, B. S. Shankaranarayana Rao, Sumantra Chattarji, et al. 2004. „Loss of Presenilin Function Causes Impairments of Memory and Synaptic Plasticity Followed by Age-Dependent Neurodegeneration". *Neuron* 42 (1): 23–36.

Shariatgorji, Mohammadreza, Per Svenningsson, a Per E Andrén. 2014. „Mass Spectrometry Imaging, an Emerging Technology in Neuropsychopharmacology". *Neuropsychopharmacology* 39 (1): 34–49. <https://doi.org/10.1038/npp.2013.215>.

Schiller, Jurgen, Rosmarie Suss, Beate Fuchs, Matthias Muller, Olaf Zschornig, a Klaus Arnold. 2007. „MALDI-TOF MS in Lipidomics". *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library* 12 (leden): 2568–79.

Sjövall, Peter, Jukka Lausmaa, a Björn Johansson. 2004. „Mass Spectrometric Imaging of Lipids in Brain Tissue". *Analytical Chemistry* 76 (15): 4271–78. <https://doi.org/10.1021/ac049389p>.

Stoykovich, Seth, a Kelly Gibas. 2019. „APOE E4, the Door to Insulin-Resistant Dyslipidemia and Brain Fog? A Case Study". *Alzheimer's & Dementia (Amsterdam, Netherlands)* 11 (prosinec): 264–69. <https://doi.org/10.1016/j.dadm.2019.01.009>.

Stübiger, Gerald, Ernst Pittenauer, Omar Belgacem, Pavel Rehulka, Kurt Widhalm, a Günter Allmaier. 2009. „Analysis of Human Plasma Lipids and Soybean Lecithin by Means of High-Performance Thin-Layer Chromatography and Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry". *Rapid Communications in Mass Spectrometry: RCM* 23 (17): 2711–23. <https://doi.org/10.1002/rcm.4173>.

Tacik, Pawel, Michael A. DeTure, Yari Carlomagno, Wen-Lang Lin, Melissa E. Murray, Matthew C. Baker, Keith A. Josephs, et al. 2017. „FTDP-17 with Pick Body-like Inclusions Associated with a Novel Tau Mutation, p.E372G". *Brain Pathology (Zurich, Switzerland)* 27 (5): 612–26. <https://doi.org/10.1111/bpa.12428>.

Tang, Jason, Alfredo Oliveros, a Mi-Hyeon Jang. 2019. „Dysfunctional Mitochondrial Bioenergetics and Synaptic Degeneration in Alzheimer Disease". *International Neurology Journal* 23 (Suppl 1): S5-10. <https://doi.org/10.5213/inj.1938036.018>.

Tseng, Bertrand P., Kim N. Green, Julie L. Chan, Mathew Blurton-Jones, a Frank M. LaFerla. 2008. „Abeta Inhibits the Proteasome and Enhances Amyloid and Tau Accumulation". *Neurobiology of Aging* 29 (11): 1607–18. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2007.04.014>.

Varma, Vijay R., Anup M. Oommen, Sudhir Varma, Ramon Casanova, Yang An, Ryan M. Andrews, Richard O'Brien, et al. 2018. „Brain and blood metabolite signatures of pathology and progression in Alzheimer disease: A targeted metabolomics study". *PLoS Medicine* 15 (1). <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1002482>.

Verma, Manish, Zachary Wills, a Charleen T. Chu. 2018. „Excitatory Dendritic Mitochondrial Calcium Toxicity: Implications for Parkinson's and Other Neurodegenerative Diseases". *Frontiers in Neuroscience* 12: 523. <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00523>.

Vuletic, Simona, Hal Kennedy, John J. Albers, Joep Killestein, Hugo Vrenken, Dieter Lütjohann, a Charlotte E. Teunissen. 2014. „Cerebrospinal fluid apolipoprotein E and phospholipid transfer protein activity are reduced in multiple sclerosis; relationships with the brain MRI and CSF lipid variables". *Multiple sclerosis and related disorders* 3 (4): 533–41. <https://doi.org/10.1016/j.msard.2014.01.004>.

Wang, Hua-Long, Yan-Yong Wang, Xin-Gang Liu, Sheng-Han Kuo, Na Liu, Qiao-Yun Song, a Ming-Wei Wang. 2016. „Cholesterol, 24-Hydroxycholesterol, and 27-Hydroxycholesterol as Surrogate Biomarkers in Cerebrospinal Fluid in Mild Cognitive Impairment and Alzheimer's Disease: A Meta-Analysis". *Journal of Alzheimer's disease : JAD* 51 (1): 45–55. <https://doi.org/10.3233/JAD-150734>.

Wang, Lijun, Hongguang Fan, Jingchun He, Lifang Wang, Zelong Tian, a Chaoran Wang. 2018. „Protective Effects of Omega-3 Fatty Acids against Alzheimer's Disease in Rat Brain Endothelial Cells". *Brain and Behavior* 8 (11): e01037. <https://doi.org/10.1002/brb3.1037>.

Wood, Paul L., Srikanth Medicherla, Naveen Sheikh, Bradley Terry, Aaron Phillipps, Jeffrey A. Kaye, Joseph F. Quinn, a Randall L. Woltjer. 2015. „Targeted Lipidomics of Frontal Cortex and Plasma Diacylglycerols (DAG) in Mild Cognitive Impairment (MCI) and Alzheimer's Disease: Validation of DAG Accumulation Early in the Pathophysiology of Alzheimer's Disease". *Journal of Alzheimer's disease : JAD* 48 (2): 537–46. <https://doi.org/10.3233/JAD-150336>.

Yang, Yue, C. Dirk Keene, Elaine R. Peskind, Douglas R. Galasko, Shu-Ching Hu, Eiron Cudaback, Angela M. Wilson, et al. 2015. „Cerebrospinal Fluid Particles in Alzheimer

Disease and Parkinson Disease". *Journal of neuropathology and experimental neurology* 74 (7): 672–87. <https://doi.org/10.1097/NEN.0000000000000207>.

Yu, Dezhi, Stuart C. Feinstein, a Megan T. Valentine. 2016. „Effects of Wild Type Tau and Disease-Linked Tau Mutations on Microtubule Organization and Intracellular Trafficking". *Journal of Biomechanics* 49 (8): 1280–85. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2015.09.043>.