

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Prírodovedecká fakulta

Katedra biochémie



Metabolomická a lipidomická štúdia vzoriek mozgovomiešneho moku pacientov s Alzheimerovou chorobou

DIPLOMOVÁ PRÁCA

Autor:	Bc. Ivana Štrauchová
Študijný program:	N0512A130009 - Biochémia
Študijný obor:	Biochémia
Forma štúdia:	Prezenčné
Vedúci práce:	Mgr. Dana Dobešová
Konzultant:	Mgr. Aleš Kvasnička
Rok:	2023

Prehlasujem, že som diplomovú prácu vypracovala samostatne, pričom uvádzam všetky použité zdroje a spoluautorstvá. Súhlasím so zverejnením svojej diplomovej práce v súlade so zákonom č. 111/1998 Z. z. o vysokých školách v znení neskorších predpisov. Bola som informovaná, že na moju diplomovú prácu sa vzťahujú práva a povinnosti vyplývajúce zo zákona č. 121/2000 Z. z. Autorský zákon v znení neskorších predpisov.

V Olomouci dňa 25.4.2023

.....
Podpis študenta

Pod'akovanie

Menovite by som rada poďakovala hlavne mojej vedúcej práce Mgr. Dane Dobešovej ďalej prof. RNDr. Davidovi Friedeckému, Ph.D. a Mgr. Alešovi Kvasničkovi za ich odborné a neoceniteľné rady a trpezlivosť. Tak isto by som chcela poďakovať celému personálu Ústavu dedičných metabolických chorôb vo Fakultnej nemocnici v Olomouci, za umožnenie vypracovanie tejto práce. Poďakovanie samozrejme patrí aj mojej rodine, ktorá ma celé štúdium podporovala a pomáhala mi prekonať prekážky s ním spojené.

Bibliografická identifikácia

Meno a priezvisko autora	Bc. Ivana Štrauchová
Názov práce	Metabolomická a lipidomická štúdia vzoriek mozgovomiešneho moku pacientov s Alzheimerovou chorobou
Typ práce	Diplomová
Pracovisko	Katedra biochémie
Vedúci práce	Mgr. Dana Dobešová
Rok obhajoby práce	2023

Abstrakt

Predložená diplomová práca sa zaoberala cielenou metabolomickou a lipidomickou štúdiou vzoriek cerebrospinalnej tekutiny (CSF) od pacientov s Alzheimerovou chorobou (AD) porovnaných so vzorkami zdravých jedincov. AD je neurodegeneratívne ochorenie, ktoré sa v súčasnej dobe ťažko diagnostikuje a nie je liečiteľné. Na obidve štúdie bol využitý kvapalinový chromatograf v spojení s hmotnostným tandemovým spektrometrom. Získané dáta boli spracované a podrobené štatistickej analýze pomocou viacrozmerných a jednorozmerných prístupov. V rámci vyhodnotenia boli vzorky rozdelené na AD pacientov a kontroly, pričom každá skupina bola ešte rozdelená na pohlavia. Po vizualizácii výsledkov boli zmeny v metabolóme a lipidóme u AD pacientov biochemicky interpretované. Metabolomická štúdia odhalila celkovo 95 metabolitov, z toho boli významné najmä metabolity spojené s argininovým metabolizmom (citrulín a kreatín) a acylkarnitíny, ktoré súviseli s β -oxidáciou mastných kyselín. Okrem nich boli ešte zvýšené hladiny metabolitov (napríklad metionín, N,N-dimetylglycín/2,2-dimetylglycín, galaktitol/manitol, alantoin) z dôvodu zmenenej aktivity enzýmov podieľajúcich sa na ich metabolizme vplyvom oxidačného stresu. Medzi ďalšie významné metabolity patrili močovina a kreatinín, ktoré boli vo zvýšenej miere transportované cez poškodenú hematolikorovu bariéru. Z lipidomickej analýzy bolo detegovaných 189 lipidov, pričom iba niektoré mali významne zmenené hladiny (najmä z tried glycerolfosfolipidov, sfingomyelínov a cholesterol esterov). Väčšina významných lipidov súvisela z rozpadom membrán neurónov. Na zmene aktivity enzýmov, poškodení hematolikorovej bariéry a rozpade membrán neurónov sa podieľajú patobiochemické procesy (napríklad oxidačný stres), ktoré vznikajú v reakcii na prítomnosť neurofibrilárnych spleťí a β -amyloidných plakov.

Kľúčové slova	Alzheimerova choroba, mozgovomiešny mok, biomarker, metabolomika, lipidomika, kvapalinová chromatografia, hmotnostná spektrometria
Počet strán	90
Počet príloh	1
Jazyk	Slovenský

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Bc. Ivana Štrauchová
Title	Metabolomics and lipidomics study of cerebrospinal fluid samples of patients suffering from Alzheimer's disease
Type of thesis	Diploma
Department	Department of biochemistry
Supervisor	Mgr. Dana Dobešová
The year of presentation	2023

Abstract

The submitted diploma thesis dealt with a targeted metabolomic and lipidomic study of cerebrospinal fluid (CSF) samples from patients with Alzheimer's disease (AD) compared with samples from healthy subjects. AD is a neurodegenerative disease that is currently difficult to diagnose and incurable. A liquid chromatograph coupled to a tandem mass spectrometer was used for both studies. The data obtained were processed and subjected to statistical analysis using multivariate and univariate approaches. For the evaluation, the samples were divided into AD patients and controls, with each group further divided into sexes. After visualization of the results, changes in the metabolome and lipidome in AD patients were biochemically interpreted. The metabolomic study revealed a total of 95 metabolites, of which metabolites associated with arginine metabolism (citrulline and creatine) and acylcarnitines, which were related to β -oxidation of fatty acids, were particularly significant. In addition, metabolites (e.g. methionine, N,N-dimethylglycine/2,2-dimethylglycine, galactitol/mannitol, allantoin) were elevated due to altered activity of enzymes involved in their metabolism due to oxidative stress. Other significant metabolites included urea and creatinine, which were transported to an increased extent across the damaged blood-CSF barrier. From lipidomic analysis, 189 lipids were detected, with only a few having significantly altered levels (mainly from the classes of glycerol phospholipids, sphingomyelins and cholesterol esters). Most of the significant lipids were related to neuronal membrane breakdown. Pathobiochemical processes (e.g., oxidative stress) that arise in response to the presence of neurofibrillary tangles and β -amyloid plaques have been implicated in altered enzyme activity, blood-CSF barrier damage, and neuronal membrane breakdown.

Keywords	Alzheimer's disease, cerebrospinal fluid, biomarker, metabolomics, lipidomics, liquid chromatography, mass spectrometry
Number of pages	90
Number of appendices	1
Language	Slovak

Obsah

1	ÚVOD	1
2	SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY	2
2.1	Alzheimerova choroba.....	2
2.1.1	Biomarkery AD v mozgovomiešnom moku	5
2.1.1.1	Tau proteín.....	5
2.1.1.2	Peptid β -amyloid ($A\beta$).....	7
2.1.1.3	Ďalšie biomarkery.....	9
2.1.2	Patobiochemické procesy spojené s AD	10
2.1.2.1	Oxidačný stres	10
2.1.2.2	Dysfunkcia citrátového cyklu a dýchacieho reťazca	11
2.1.2.3	Neurozápal	13
2.1.2.4	Acetylcholín.....	14
2.2	Cerebrospinálna tekutina	16
2.2.1	Funkcia	17
2.2.2	Zloženie	17
2.2.3	Hematolikvorová bariéra	23
2.2.4	Transport látok cez hematolikvorovu bariéru	24
2.2.4.1	Paracelulárny transport	25
2.2.4.2	Transcelulárny transport	25
2.2.5	Lumbálna punkcia	27
2.3	Metabolomika a lipidomika.....	27
3	EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	31
3.1	Materiál a vybavenie.....	31
3.1.1	Biologický materiál	31
3.1.2	Chemikálie.....	31
3.1.3	Prístroje a vybavenie	33
3.1.4	Programy	33
3.2	Metódy	33
3.2.1	Príprava extrakčného činidla	33
3.2.2	Extrakcia metabolitov a lipidov	33
3.2.3	Vzorka kontroly kvality (QC)	34
3.2.4	Príprava mobilných fáz	34
3.2.5	Kvapalinová chromatografia s tandemovou hmotnostnou spektrometriou	34

3.2.6	Získanie dát	37
3.2.7	Spracovanie dát a štatistická analýza	37
4	VÝSLEDKY	40
4.1	Detegované metabolity a lipidy	40
4.2	Viacrozmerná štatistická analýza.....	49
4.2.1	Vyhodnotenie AD pacientov a kontrol	49
4.2.2	Vyhodnotenie AD pacientov a kontrol rozdelených podľa pohlavia	53
4.3	Jednorozmerná štatistická analýza.....	55
4.3.1	Vyhodnotenie AD pacientov a kontrol rozdelených podľa pohlavia	55
4.3.1.1	Výsledky cielej metabolomickej analýzy	55
4.3.1.2	Výsledky cielej lipidomickej analýzy	61
5	DISKUSIA	67
6	ZÁVER	75
7	LITERATÚRA.....	77
8	ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK	87
9	ZOZNAM PRÍLOH	90

Ciele práce

Teoretická časť

- Vypracovanie literárnej rešerše týkajúcej sa Alzhiemerovej choroby, mozgovomiešneho moku, cielenej metabolomiky a lipidomiky

Experimentálna časť

- Cielená LC-MS/MS metabolomická analýza vzoriek mozgovomiešneho moku od pacientov s Alzheimerovou chorobou
- Cielená LC-MS/MS lipidomická analýza vzoriek mozgovomiešneho moku od pacientov s Alzheimerovou chorobou
- Štatistické spracovanie a biochemická interpretácia výsledkov ochorenia

1 ÚVOD

Alzheimerova choroba (AD) je neurodegeneratívne ochorenie, ktoré sa prejavuje stratou pamäte a kognitívnych funkcií (myslenie, reč, udržiavanie pozornosti, učenie). V neskorších štádiách dochádza až k problémom s každodennými činnosťami. Diagnostika tohto nevyliciteľného ochorenia spočíva vo vyšetrení lekárom a laboratórnych testoch, ktoré nie sú dostatočne včasné a špecifické.

Na rozvoji AD sa podieľajú najmä dva patologické procesy, ktoré sa prejavujú tvorbou nerozpustných proteínových štruktúr. Jednými z nich sú intracelulárne neurofibrilárne splete pozostávajúce z hyperfosforylovaného tau proteínu. Druhou príčinou je zhlukovanie extracelulárneho β -amyloidného peptidu do β -amyloidných plakov. Aj napriek tomu, že existujú rizikové faktory, ktoré sa môžu podieľať na rozvoji týchto patologických procesov, nie sú známe presné príčiny ich vzniku.

V tejto diplomovej práci bola vykonaná cielená metabolická a lipidomická štúdia vzoriek mozgovomiešneho moku pacientov s AD, ktoré boli porovnané so zdravými jedincami, ktorí slúžili ako kontroly. Z dôvodu pozorovaní rozdielnych zmien u pacientov a pacientiek boli vzorky rozdelené z dvoch do štyroch skupín na základe pohlavia. Práca bola zameraná na detegovanie významných metabolických a lipidových markerov spojených s patológiou AD. Pre obidve štúdie bola využitá vysokoúčinná kvapalinová chromatografia spojená s tandemovou hmotnostnou spektrometriou. Získane dáta boli spracované, vyhodnotené prostredníctvom viacrozmernej (nesupervizovanej aj supervizovanej) a jednorozmernej analýzy a nakoniec biochemicky interpretované.

Výskum v oblasti analýzy zmeny metabolitov a lipidov u AD pacientov dopomáha nie len k objaveniu nových biomarkerov na presnejšiu a rýchlejšiu diagnostiku ochorenia, ale aj k získavaniu informácií o narušených biochemických dráhach a tak k pochopeniu vzniku a vplyvu patobiochemických procesov.

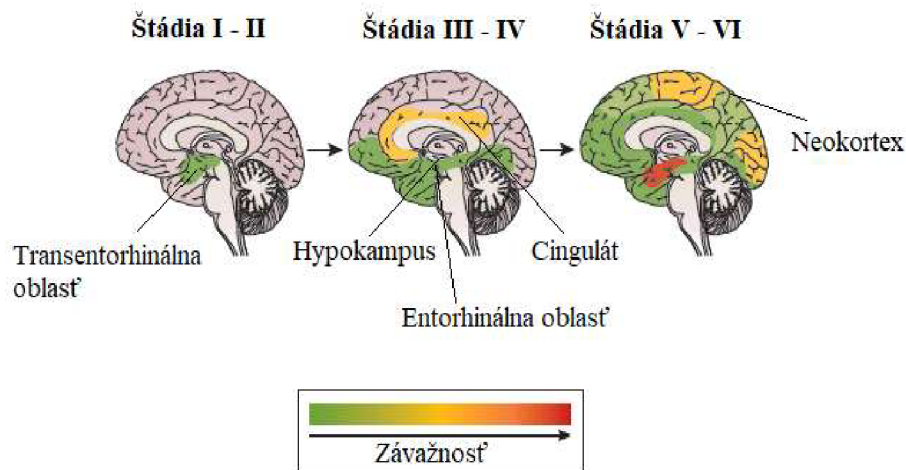
2 SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY

2.1 Alzheimerova choroba

Alzheimerova choroba (AD), je neurodegeneratívne ochorenie mozgu patriace medzi sekundárne tauopatie. Tauopatie sú ochorenia, ktorých charakteristickým znakom je ukladanie abnormálnych foriem tau proteínu v mozgu. Primárne tauopatie (progressívna supranukleárna obrna, Pickova choroba, frontotemporálna demencia a ďalšie) sa vyznačujú najmä abnormálnymi formami tau proteínu, zatiaľ čo sekundárne tauopatie (napríklad Alzheimerova choroba) sú spojené mimo poruchy tau proteínu s inou ďalšou zložkou (Rusina et al., 2015; Kovacs, 2018).

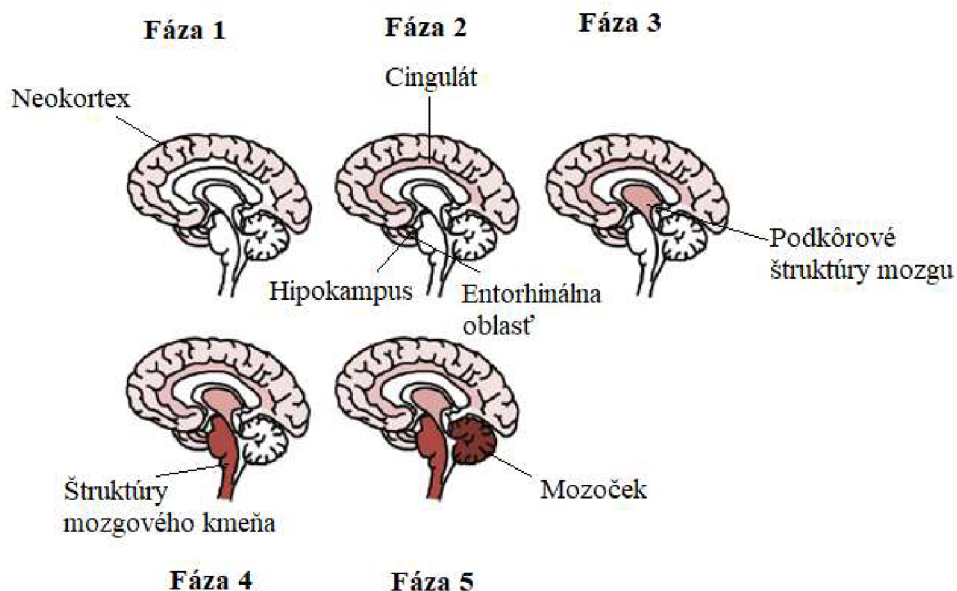
AD sprevádzajú hlavne teda dve patológie: prítomnosť nerozpustných intracelulárnych neurofibrilárnych spleťí tau proteínu a extracelulárnych β -amyloidných plakov. Ide o najčastejší typ demencie u starších pacientov (zvyčajne nad 65 rokov). Pri tomto ochorení degenerujú neuróny, čo má za následok rozpad nervových spojení a stratu prenosu signálu. Prejavuje sa rôznymi spôsobmi, kedy najčastejším klinickými príznakmi sú postupne sa zhoršujúce kognitívne funkcie: schopnosť zapamätať si nové informácie, problémy s orientáciou v priestore a čase, poruchy reči a porozumenia slovám. V priebehu ochorenia dochádza k zmenám osobnosti a problémom s každodennými činnosťami (Dincer, 2016).

Braak (1995) rozdelil ochorenie do šiestich štádií (Obr. 1) podľa rozsahu neurofibrilárnych spleťí, ktoré vytvára tau proteín. Tie sa pomaly a postupne vyvíjajú a rozširujú. V štádiách I – II (asymptomatické a predklinické štádia) je postihnutá transentorhinálna oblasť, ktorá zohráva úlohu pri tvorbe pamäte, ale zatiaľ nie sú prítomné klinické príznaky. V štádiách III – IV (rozvoj miernej kognitívnej poruchy - MCI) dochádza k zhoršeniu kognitívnych výkonov, avšak ochorenie neobmedzuje bežný každodenný život. Toto zhoršenie je spôsobené rozšírením neurofibrilárnych spleťí do entorhinálnej oblasti, hipokampu a cingulátu (časti zodpovedné za kognitívne funkcie). V posledných štádiách V – VI (klinická diagnóza AD) sú veľké množstvá neurofibrilárnych spleťí prakticky vo všetkých pododdieloch mozgovej kôry, pričom dochádza aj k deštrukcií neokortexu. V týchto prípadoch sú prítomné už výrazné klinické príznaky, ktoré ovplyvňujú každodenný život (Braak, 1995; Perneczky, 2018).



Obr. 1: Znáozornenie postihnutých oblastí mozgu v rôznych štádiách AD podľa rozsahu neurofibrilárných spleťí. Upravené a prevzaté podľa (Masters et al., 2015).

Thal (2005) určil päť fáz ukladania β -amyloidných plakov (tvorených z β -amyloidných peptidov) v mozgu človeka pri Alzheimerovej chorobe (Obr. 2). Rozdelenie je založené na prítomnosti, respektíve neprítomnosti, ložísk β -amyloidných plakov v určitej časti mozgu (Thal, 2005; Perneczky, 2018).



Obr. 2: Fáze AD podľa ukladania β -amyloidných plakov v zvýraznených častiach mozgu. Upravené a prevzaté podľa (Perneczky, 2018).

Dôvod vzniku tejto neurodegeneratívnej choroby nie je doposiaľ objasnený, avšak existuje niekoľko faktorov, ktoré môžu spôsobovať riziko vzniku AD (Tab. 1) (Dincer, 2016).

Tab. 1: Rizikové faktory vzniku AD. Prevzaté a upravené podľa (Dincer, 2016).

Rizikový faktor	Špecifikácia rizikového faktoru
genetické mutácie	dedičné mutácie v génoch pre <i>APP</i> (<i>amyloidový prekurzorový proteín</i>)
vek	nad 65 rokov
rodinná história	APOE4 (apolipoproteín E4), neznáme genetické mutácie alebo spoločné faktory prostredia
Iné ochorenia	<i>Diabetes mellitus</i> , hypertenzia, hyperlipidémia, obezita
psychosociálne faktory	nižšie vzdelanie, sociálna izolácia, stres
úraz	traumatické poškodenie mozgu
nedbalý spôsob života	fajčenie, sedavý životný štýl
deficit látok	vitamín D, foláty, vitamín B12 a antioxidanty vo výžive a stravovaní

Diagnostika ochorenia začína u neurológa, ktorý vykoná sériu vyšetrení ako sú behaviorálne a fyzikálne hodnotenie. Zároveň môže lekár získať rodinnú anamnézu (Dincer, 2016). Okrem týchto vyšetrení, je možné vykonať klinickú diagnostiku založenú na biomarkeroch, vďaka ktorým je možné zistiť neuropatologické zmeny. Tieto biomarkery rozdeľujeme medzi dve hlavné kategórie, a to biomarkery telesných tekutín (najčastejšie krv a mozgovomiešny mok) a neurozobrazovanie. Bohužiaľ zatiaľ neexistujú dostatočne špecifické biomarkery, podľa ktorých by bolo možné s istotou určiť, že sa jedná o Alzheimerovu chorobu a je potrebné sledovať aj zmienené príznaky, ktoré sa však začínajú prejavovať až vo vyšších fázach ochorenia a pacient ich často priraduje iným faktorom a ochoreniam. Z týchto dôvodov stále prebiehajú výskumy zaoberajúce sa hľadaním špecifických biomarkerov, ktoré by ochorenie odhalili v skorších fázach AD (Pernecky, 2018).

2.1.1 Biomarkery AD v mozgovomiešnom moku

Napriek tomu, že kompletne neuropsychologické hodnotenie je stále najvýznamnejším spôsobom správnej diagnostiky Alzheimerovej choroby, dopredu postupuje aj výskum biomarkerov a neurozobrazovacie techniky na diagnostiku (Dincer, 2016).

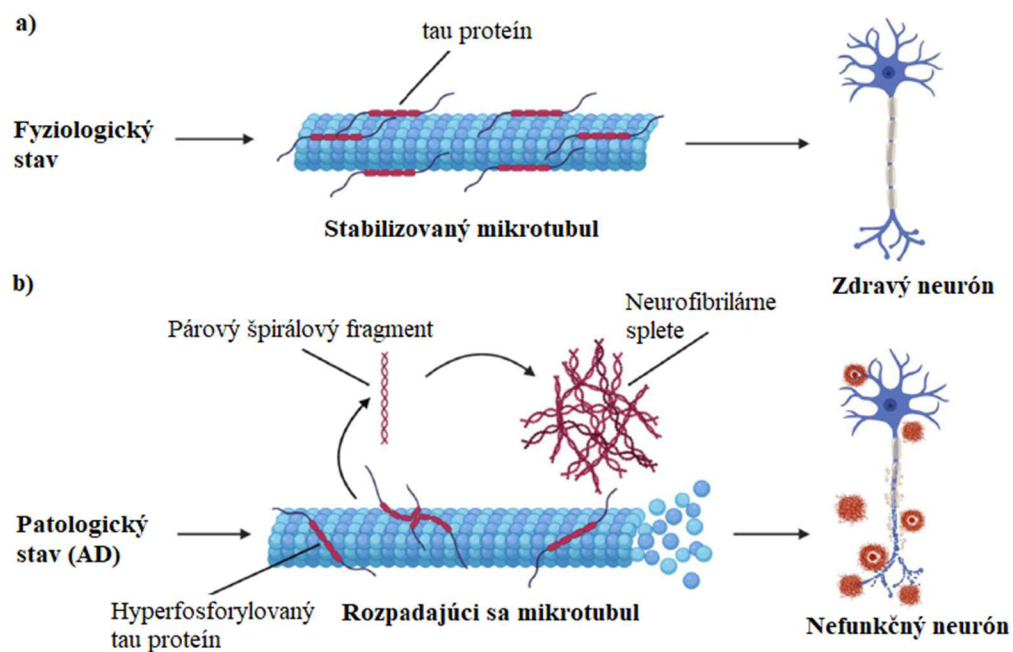
Výhodou biomarkerov je že sa ich hladiny v mozgovomiešnom moku menia niekoľko rokov pred klinickými príznakmi AD. Napríklad hladiny β -amyloidného peptidu sa začínajú znižovať v CSF 25 rokov pred symptómami, zatiaľ čo hladiny tau proteínu sa zvyšujú v likvore 15 rokov pred nástupom symptómov. Na druhú stranu tieto biomarkery nie sú špecifické pre jediné ochorenie a preto je ešte treba mnohých výskumov, kedy sa možno zistí správna kombinácia biomarkov na presnú a špecifickú diagnostiku ochorenia (Pernecky, 2018).

2.1.1.1 Tau proteín

Proteín tau, intracelulárny proteín, je kódovaný génom *MAPT* nachádzajúcim sa na chromozóme *17q21.3* (Kovacs, 2018). Existuje v šiestich izoformách obsahujúcich 352-441 aminokyselín (Coedert et al., 1989). Jeho hlavnou funkciou je stabilizácia a zostavovanie mikrotub (Obr. 3a), to sa deje keď je proteín v defosforylovej podobe. Mikrotubuly sú v nervových bunkách dôležité pre normálnu konfiguráciu neuronálnych predĺžení, transport molekúl v axónoch a polarizáciu buniek (Spillantini & Goedert, 2013; Dincer, 2016). Pri Alzheimerovej chorobe dochádza k hyperfosforylácii tau proteínu v neurónoch, čím sa stráca ich schopnosť viazať

sa na mikrotubuly a okrem toho dochádza k vzájomnej väzbe tau proteínov a k tvorbe neurofibrilárnych spleťí (Obr. 3b). To má za následok narušenie prenosu signálov medzi nervovými bunkami, trvalé poškodenie neurónov a ich apoptózu (Blennow et al., 2001; Lewczuk et al., 2004; Dincer, 2016).

Pre AD sú jednými z biomarkerov zvýšené hladiny celkového tau proteínu (t-tau) a fosforylovaného tau proteínu (p-tau) v mozgovomiešnom moku. (Lewczuk et al., 2004; Koničková et al., 2022).



Obr. 3: Stabilizácia mikrotubul pomocou tau proteínu v zdravom mozgu (a). Hyperfosforylovaný tau proteín sa nedokáže viazať a stabilizovať mikrotubuly v mozgovej tkaní zasiahnutej AD (b). Prevzaté a upravené podľa (Van Oostveen & De Lange, 2021).

2.1.1.2 Peptid β -amyloid ($A\beta$)

Ďalším biomarkerom pre AD je β -amyloidný ($A\beta$) peptid, konkrétne znížená hladina jeho izoformy $A\beta_{42}$ ako aj pomer dvoch izoformiem tohto peptidu $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ v cerebrospinalnom moku (CSF), z dôvodu, že $A\beta_{42}$ peptid sa agreguje do $A\beta$ oligomérov a následne do amyloidných plakov, ktorých množstvo v CSF naopak rastie (Pernecky, 2018; Koničková et al., 2022).

$A\beta$ peptid vzniká v extracelulárnom prostredí proteolytickým štiepením transmembranového amyloidného prekursorového proteínu (APP). APP je štiepený v membráne bunky dvomi dráhami a to neamyloidogénnou a amyloidogénnou (Obr. 4). Neamyloidogénnou dráhou je APP štiepený najskôr α -sekretasou (EC 3.4.24.46), kedy vzniká rozpustný peptid amyloidného prekursorového proteínu (sAPP) α a C-terminálny fragment s 83 aminokyselinami (α CTF89). Následne je α CTF89 štiepený γ -sekretasou (EC 3.4.26.46), pričom výsledkom je APP intracelulárna doména (AICD) a malý fragment p3 (Murphy & LeVine, 2010; Uddin et al. 2020).

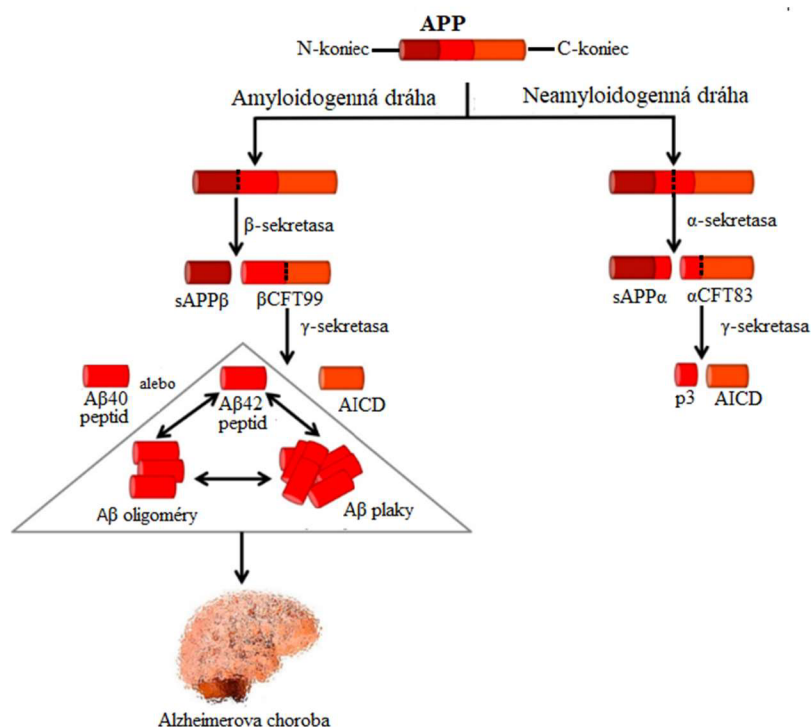
Amyloidogénnou dráhou je APP štiepený najskôr β -sekretasou (EC 3.4.23.46). Po tomto štiepení vzniká sAPP β a C-terminálny fragment s 99 aminokyselinami (β CTF99). β CTF99 zostáva viazaný na membráne a je následne štiepený komplexom γ -sekretasou za vzniku AICD (rovnako ako v prípade neamyloidogénnej dráhy) a izoformiem $A\beta$ peptidu (Murphy & LeVine, 2010; Uddin et al. 2020).

V amyloidogénnej dráhe enzým γ -sekretasa neštiepi stále na tom istom mieste, čo ma za následok vznik peptidov s rôznou dĺžkou aminokyselinového reťazca, pričom najčastejšie vyskytujúce izoformy sú rozpustný $A\beta_{40}$ a nerozpustný $A\beta_{42}$ (Obr. 4) (Murphy & LeVine, 2010). U zdravých jedincov prevláda tvorba $A\beta_{40}$ (viac ako 90%), zatiaľ čo $A\beta_{42}$ je najviac zastúpená izoforma u pacientov s AD v podobe $A\beta$ plakov (Pernecky, 2018).

$A\beta$ vzniká v nižších množstvách (pmol.l^{-1}) aj v zdravom mozgu, kedy jeho funkciou okrem iného je aj zlepšenie synaptickej plasticity a pamäte, čo je presný opak jeho funkcie vo vyšších hladinách. Tento účinok je nazývaný horméza. Nižšia dávka je stimulačná a vyššia inhibičná (Puzzo et al., 2008). Pikomolárne koncentrácie $A\beta$ aktivujú fosfatidylinozitol-3 kinázy (podieľajú na tvorbe pamäte), nikotínový acetylcholínový receptor (tým zvyšujú produkciu acetylcholínu v hipokampe) a mitogénom aktivované

proteínkinázy. Ďalej spôsobujú aj presynaptické zosilnenie, rast neuritov a prežitie hipokampálnych neurónov. Zatiaľ čo pri vyšších koncentráciách inhibujú kinázy a receptory (vrátane acetylcholínových), spôsobujú presynaptický zoslabenie a apoptózu neurónov (Whitson et al., 1989; Morley & Farr, 2014).

Hardy a Higgins (1992) ako prvý vytvorili hypotézu amyloidnej kaskády. Pričom zistili, že ukladanie amyloidného proteínu má za následok tvorbu A β plakov, stratu neurónov, poškodenie ciev a je jednou z príčin rozvoja Alzheimerovej choroby (Hardy & Higgins, 1992).



Obr. 4: (Ne)amyloidogenné dráhy štiepenia APP a možný vznik AD. Upravené a prevzaté (Uddin et al. 2020). APP, amyloidný prekursorový proteín; sAPP, rozpustný peptid amyloidného prekursorového proteínu; α CTF89, C terminálny fragment 83; β CTF99 fragment s 99 aminokyselinami; AICD, APP intracelulárna doména; p3, malý fragment p3.

2.1.1.3 Ďalšie biomarkery

Medzi ďalšie potencionálne biomarkery v mozgovomiešnom moku u pacientov s Alzheimerovou chorobou patria metabolit (myoinozitol), enzým β -sekretasa a ďalšie proteíny (neurogranin, synaptozomálny asociovaný proteín (SNAP25), visinínu podobný proteín 1 (VILIP-1), rozpustný spúšťací receptor exprimovaný na myeloidných bunkách 2 (sTREM 2) (Heslegrave et al., 2016; Voevodskaya et al., 2016; Koničková et al., 2022).

Myoinozitol sa radí medzi alkoholové sacharidy. Ide o metabolit, ktorého funkciou je transdukcia bunkových signálov prostredníctvom regulácie steroidných hormónov a neurotransmitterov. Zvýšená hladina myoinozitolu v mozgu je častým nálezom u pacientov s Alzheimerovou chorobou. Okrem zvýšenej hladiny myoinozitolu v mozgu bola objavená aj jeho zvýšená hladina v CSF. Problémom je, že zvýšené hladiny tohto metabolitu, nie sú iba pri AD, ale môžu sa vyskytovať aj napríklad pri traumatickom poranení mozgu (Garnett et al., 2000; Voevodskaya et al., 2016; Piersson et al., 2021).

Potencionálny biomarker AD je aj receptor sTREM2, ktorý je exprimovaný na povrchu buniek myeloidnej línie (monocyty, makrofágy, osteoklasty, mikroglie) v centrálnom nervovom systéme a je zapojený do vrodenej imunity. Zvýšené hladiny sTREM2 v likvore boli zistené až po odhalení zmien hladín p-tau proteínu a A β 42 peptidu. Na druhú stranu sTREM2 má významnú úlohu vo veľkom množstve neurologických porúch, preto nemusí byť špecifický pre AD, avšak mohlo by sa ním sledovať progresia tohto ochorenia (Suárez-Calvet et al., 2016; Heslegrave et al., 2016; Perneckzy, 2018).

Hladina β -sekretasy, sa pri Alzheimerovej chorobe v likvore zvyšuje. Pri vysokých hladinách SNAP25 a vysokých hladinách neurogranínu je možné v CSF u pacientov s miernou kognitívnou poruchou predpokladať progres do AD. Tak isto aj zvýšené hladiny VILIP-1 v mozgovomiešnom moku môžu signalizovať nástup AD (Koničková et al., 2022).

2.1.2 Patobiochemické procesy spojené s AD

Mechanizmus vzniku a rozvoja Alzheimerovej choroby je veľmi zložitý. Presná biochemická charakterizácia, ktorá by bola zodpovedná za vznik AD ešte stále nie je známa. Avšak niektorými z mechanizmov, ktoré by mohli rozvinúť predstavu o patobiochémií ochorenia sú: oxidačný stres, mitochondriálna disfunkcia, neurozápal a znížená hladina acetylcholínu (Gadoth & Goebel, 2011; Dincer, 2016).

2.1.2.1 Oxidačný stres

Oxidačný stres sa podieľa na neurodegeneratívnych, ale aj na kardiovaskulárnych, nádorových alebo autoimunitných ochoreniach. Je spôsobený nerovnováhou medzi tvorbou a odstraňovaním reaktívnych foriem kyslíka (ROS) a dusíka (RNS). (Armstrong, 2016). Mimo iné, prooxidačne pôsobia aj vyššie hladiny A β peptidu a neurofibrilárne splete, ku príkladu tým, že majú schopnosť stimulovať mozgové bunky (napríklad mikroglie alebo astrocyty) pre tvorbu ROS a RNS. Mikroglie a astrocyty produkujú ROS a RNS v snahe odstrániť A β plaky a neurofibrilárne splete (Gadoth & Goebel, 2011).

ROS a RNS sú vysoko reaktívne molekuly, ktoré ľahko reagujú mimo iné s lipidmi, proteínmi (prevažne enzýmami) a nukleovými kyselinami, pričom menia ich štruktúru a funkciu. Možno ich rozdeliť na voľné radikály a neradikálové formy (Armstrong, 2016; Krumova & Cosa, 2016). Voľné radikály sú atómy a molekuly, ktoré obsahujú jeden alebo viac nespárovaných elektrónov vo svojom vonkajšom orbitály kyslíka alebo dusíka (Šišková, 2015). Jedná sa o superoxidový anión, hydroxylový radikál, peroxylový radikál, alkoxylový radikál, hydroperoxylový radikál, oxid dusnatý a oxid dusičitý. Na druhú stranu v rámci neradikálových foriem možno nájsť napríklad: singletový kyslík, peroxyinitrit, oxid dusitý, kyselinu dusitú a ďalšie (Krumova & Cosa, 2016).

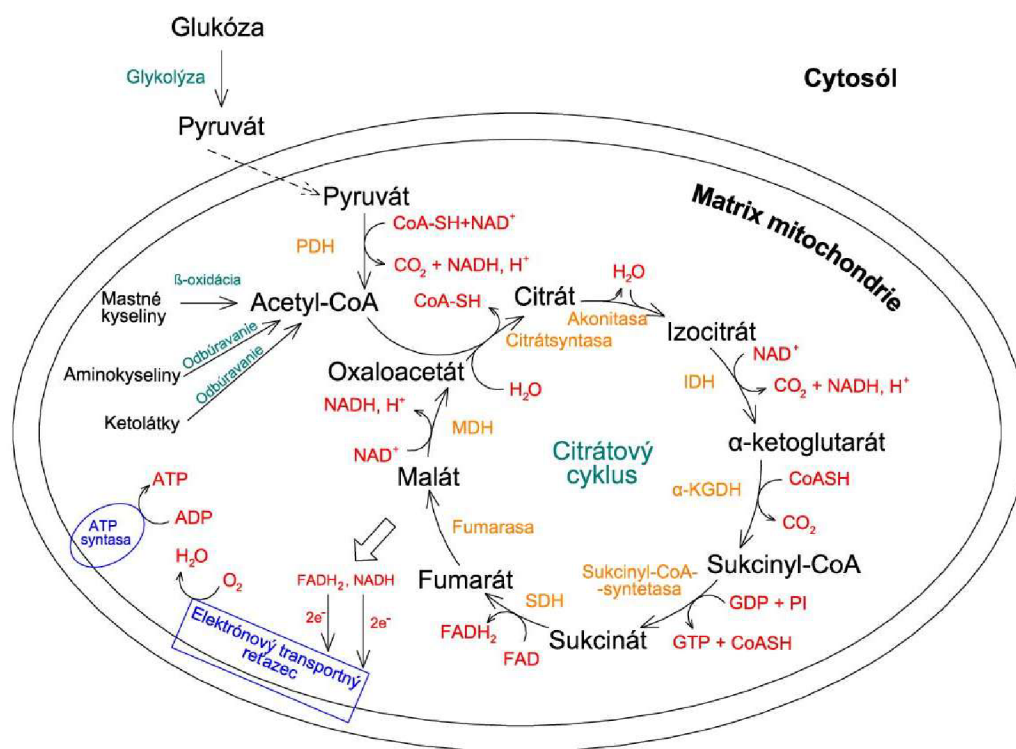
Zdroje ROS a RNS možno rozdeliť na endogénne a exogénne. Medzi exogénne zdroje patria ultrafialové svetlo, chemoterapeutické látky, environmentálne toxíny alebo ionizujúce žiarenie. Medzi najčastejšie endogénne, intracelulárne, zdroje prislúchajú: možná tvorba ROS pri prechode elektrónov elektrónovým transportným reťazcom v mitochondriách a produkcia ROS enzýmom nikotínamidadeníndinukleotidfosfát oxidasou (EC 1.6.3.1) (Krumova & Cosa, 2016). Hlavným endogénnym zdrojom RNS je enzým syntasa oxidu dusnatého (NOS, EC 1.14.13.39). (Šišková, 2015).

Tvorba voľných radikálov je za fyziologických stavov kompenzovaná antioxidantmi (AOX), ktorým sú ku príkladu enzýmy katalasa (EC 1.11.1.6), superoxid dismutasa (EC 1.15.1.1), glutathion peroxidasa (EC 1.11.1.9), ale aj polyfenoly, glutatión, koenzým Q alebo vitamíny (A, E, K). AOX pôsobia tak, aby zabránili radikálovým reakciám a tým ochránili organizmus voči jeho poškodeniu, pričom každý AOX sú účinné iba v niektorých častiach bunky a pôsobia na určité ROS/RNS (Šišková, 2015).

2.1.2.2 Dysfunkcia citrátového cyklu a dýchacieho reťazca

Mitochondrie sú producentmi bunkovej energie, vznikajúcej prechodom elektrónov cez komplexy I-IV dýchacieho reťazca (elektrónového transportného reťazca) a tvorbou adenzinotrifosfátu (ATP) pomocou oxidatívnej fosforylácie ATP-syntasou (EC 7.1.2.2, komplex V). Zmienené komplexy sú umiestnené na vnútornej membráne a prepojujú medzimembránový priestor s matrix mitochondrie (Obr. 5) (Cadonic et al., 2016).

Konečným akceptorom elektrónu je na komplexe IV kyslík redukujúci sa na vodu. Zároveň ATP-syntasou dochádza k tvorbe ATP z adenzindifosfátu (ADP) a voľného anorganického fosfátu, kedy energia na tento proces je uložená v elektrochemickom gradiente H^+ . Nosičmi elektrónov pre elektrónový transportný reťazec sú redukované koenzýmy nikotínamidadeníninukleotid (NADH) a flavínadeníninukleotid ($FADH_2$). NADH dodáva elektróny komplexu I za účasti NADH dehydrogenasy (EC 7.1.1.2), zatiaľ čo $FADH_2$ dodáva elektróny komplexu II za účasti sukcinátdehydrogenasy (SDH, EC 1.3.5.1). Oba redukované koenzýmy sú v mitochondriách získavané pomocou citrátového cyklu, do ktorého vstupuje acetyl koenzým A (acetyl-CoA). Ten vzniká reakciami pyruvátdehydrogenasového komplexu (PHD, EC 1.2.4.1) z pyruvátu, produkovaného v cytosóle bunky. Ďalšími zdrojmi acetyl-CoA sú priamo v matrix mitochondrií β -oxidácia mastných kyselín, odbúravanie ketolátok a aminokyselín (Cadonic et al., 2016). Grafické znázornenie zdrojov acetyl-CoA, citrátového cyklu a dýchacieho reťazca sú uvedené v Obr. 5.



Obr. 5: Grafické znázornenie zdrojov acetyl-CoA, citrátového cyklu a dýchacieho reťazca. Elektrónový transportný reťazec zahŕňa komplexy I-IV. α -KGDH, α -ketoglutarátdehydrogenasa; ADP, adenosindifosfát; ATP, adenosíntrifosfát; CoA-SH / CoA, koenzým A; FAD, oxidovaný koenzým flavínadenindinukleotid; FADH₂, redukovaný koenzým flavínadenindinukleotid; GDP, guanosindifosfát; GTP, guanosíntrifosfát; IDH isocitratdehydrogenasa; MDH, malátdehydrogenasa; NAD⁺, oxidovaný koenzým nikotínamíadenindinukleotid; NADH, redukovaný koenzým nikotínamíadenindinukleotid; Pi, fosfát; SDH, sukcinátdehydrogenasa.

Najviac preskúmanými patologickými procesmi v mitochondriách neurónov pri AD sú narušenie aktivity enzýmu PDH, enzýmov v citrátovom cykle a tiež k poškodeniam v dýchacom reťazci (Cadonic et al., 2016).

U časti enzýmov v prvej polovici citarového cyklu dochádza k zníženiu ich aktivity. Medzi tieto enzýmy patria: isocitratdehydrogenasa (IDH, EC 1.1.1.41) a α -ketoglutarat dehydrogenasa komplexu (KGDH, EC 1.2.4.2, EC 2.3.1.61, EC 1.6.4.3) (Bubber et al., 2005). Znížená aktivita týchto enzýmov je spôsobená ich oxidáciou prostredníctvom ROS (Tabatabaie et al., 1996; Gibson et al., 2005; Sims et al., 2010). Tieto procesy vedú k zníženej produkcii NADH, a tým k zníženej dostupnosti elektrónov pre elektrónový transportný reťazec. Znížená rýchlosť reakcií, ktoré prebiehajú v prvej polovici cyklu môže byť čiastočne kompenzované zvýšením aktivít enzýmov v druhej polovici cyklu: SDH a malátdehydrogenasy (MDH, EC 1.1.1.37) (Bubber et al., 2005).

V rámci dýchacieho reťazca v mitochondriách neurónov bola u pacientov s AD zistená znížená najmä aktivita komplexu IV (cytochróm c-oxidasa, EC 1.9.3.1) (Parker & Parks, 1995; Maurer et al., 2000). Komplex IV môže byť inhibovaný A β peptidom. Hoci je A β peptid prevažne extracelulárny, existujú dôkazy, že sa môže translokovať do bunky (neurónov) a následne prostredníctvom mitochondriálnych prenášačov do mitochondrií (Devi et al., 2006; Hansson Petterson et al., 2008; Takuma et al., 2009). A β peptid má schopnosť vytvárať komplexy s hemovými skupinami, ktoré tvoria veľkú časť cytochróm c-oxidasy. Po interakcii A β peptidu s hemovými skupinami, dochádza k zníženiu ich funkcie a tým k zníženiu aktivity komplexu IV, čo v konečnom dôsledku spôsobuje zníženú syntézu ATP (Canevari et al., 1999, Cadonic et al., 2016).

2.1.2.3 Neurozápal

Zápal je prirodzeným mechanizmom pri obrane organizmu proti zraneniam a infekciám (Cadonic et al., 2016). Neurozápal je potom spojený s centrálnou nervovou sústavou. Pri AD sú hlavnými zložkami neurozápalu mikroglie a astrocyty (Tuppo & Arias, 2005).

Mikroglie sú prítomné vo všetkých častiach mozgu (Heneka et al., 2015). Zodpovedajú za imunitný obranný systém a sprostredkovávajú bunkovú odpoveď na patologické procesy. V tomto ohľade majú mikroglie schopnosť fagocytózy, uvoľňovanie prozápalových mediátorov vrátane neurotoxických cytokínov, proteínov komplementu (C1-C9) a v neposlednej rade tiež produkujú ROS a RNS. (Tuppo & Arias, 2015; Heneka et al., 2015).

V mozgovej tkaní postihnutej AD sa mikroglie aktivujú v reakcii na prítomnosť A β plakov a neurofibrilárnych spleťí. To vedie jednak k tvorbe ROS a RNS, čo má za následok zvýšenie oxidačného stresu a zároveň k expresii hlavného histokompatibilného komplexu II (MHC II), ktorý na povrchu mikroglíí spúšťa sekréciu cytotoxických látok, kedy v prvom rade dochádza k vytvoreniu akútneho zápalu, ktorý napomáha odstraňovaniu A β plakov. Na druhú stranu pri abnormálnom množstve A β plakov dochádza k neustálej aktivácii mikroglíí, čo vedie k chronickému zápalu a následnej apoptóze neurónov (Tuppo & Arias, 2005; Yoshiyama et al., 2007; Gadoth & Goebel, 2011; Heneka et al., 2015).

Astrocyty sú najviac zastúpeným typom gliových buniek v mozgu. Medzi ich fyziologické funkcie patria: prispievajú k udržiavaniu hematoencefalitickej bariéry

(bariéra medzi krvou a mozgom) prostredníctvom parakrinných interakcií s endotelovými bunkami, regulácia iónovej homeostáze alebo regulujú obrat neurotransmiterov (Verkhratsky & Parpura, 2016; Herdon et al., 2017). Okrem iného sa podieľajú na vytváraní zápalovej odpovede, pričom niektoré astrocyty môžu byť indukované aktivovanými mikrogliami (Liddel et al., 2017; Monterey, 2021).

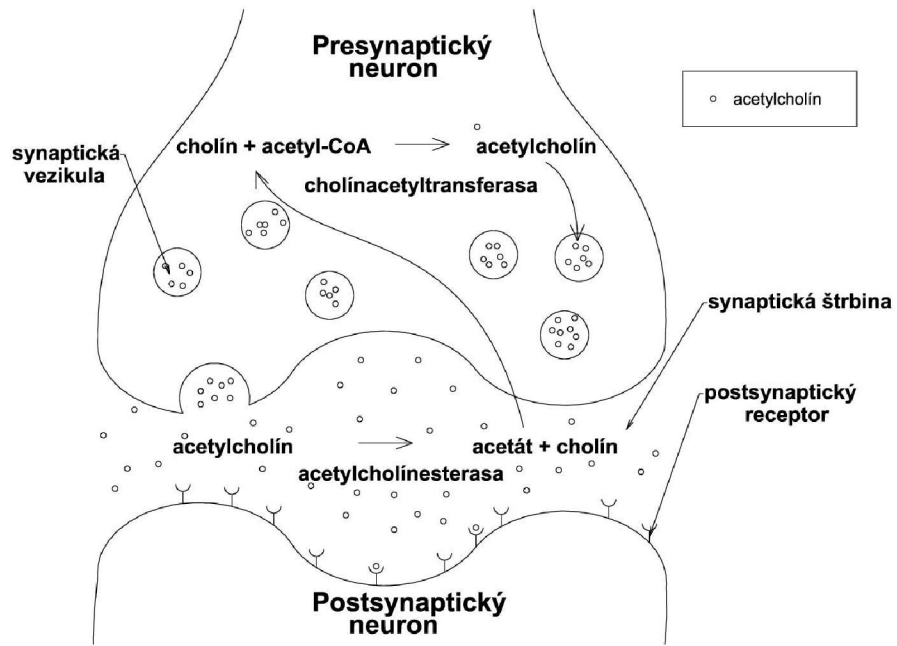
Astrocyty sa stávajú „reaktívnymi“ (podliehajú štrukturálnym, funkčným a molekulárnym zmenám) v reakcii na viaceré patologické stavy, medzi ktoré patrí aj AD (Escartin et al., 2021). Pri tomto ochorení sa reaktívne astrocyty zhlukujú v mozgovom tkanive, kde sa vyskytujú A β plaky a neurofibrilárne splete (Verkhratsky & Parpura, 2016). V reaktívnej forme, podobne ako mikroglie, sú schopné fagocytovať A β plaky a zároveň vylučovať prozápalové molekuly: interleukíny, leukotriény, prostaglandíny, tromboxány, proteázy, koagulačné proteíny a proteíny komplementu. Okrem toho astrocyty exprimujú enzým NOS, čím prispievajú k zvýšeniu RNS. Týmito procesmi sa zvyšuje neurozápalová odpoveď a podporuje sa vznik chronického zápalu (Tuppo & Arias, 2005; Heneka et al., 2015).

2.1.2.4 Acetylcholín

Acetylcholín (ACh) je excitačný neurotransmiter nevyhnutný pre správne fungovanie pamäte a schopnosti učenia (Francis, 2005). Je prenášaný u cholinergných neurónov pomocou synapsie, čím dochádza k prenosu nervového vzruchu. ACh je syntetizovaný cholínacetyltransferasou (EC 2.3.1.6) z cholínu a acetyl-CoA v presynaptickej časti axónu neurónu a následne je transportovaný do synaptických vezikúl acetylcholínovým transportérom (Obr. 6). ACh sa po uvoľnení do synaptickej štrbiny viaže na postsynaptický receptor (AChR), a tým prenáša signál medzi axonmi dvoch neurónov (Rand, 2017). Existujú dva rôzne typy AChR: nikotínové acetylcholínové receptory (nAChR) a muskarínové acetylcholínové receptory (mAChR) (Oddo & LaFerla, 2006). Pri nadbytku ACh v synaptickej štrbine, dochádza k jeho rozpadu na cholín a acetát pomocou acetylcholínesterasy (EC 3.1.1.7). Cholín je následne transportovaný späť do presynaptickej časti cholinergného neurónu prostredníctvom cholinového transportéra (Rand, 2017).

U pacientov s AD bola zistená znížená koncentrácia acetylcholínu v častiach mozgu, napríklad v temporálnom kortexe (jeden zo štyroch lalokov v mozgovej kôre) (Richter et al., 1980). Dôvodom tejto zmeny môže byť ako znížená aktivita cholínacetyltransferasy,

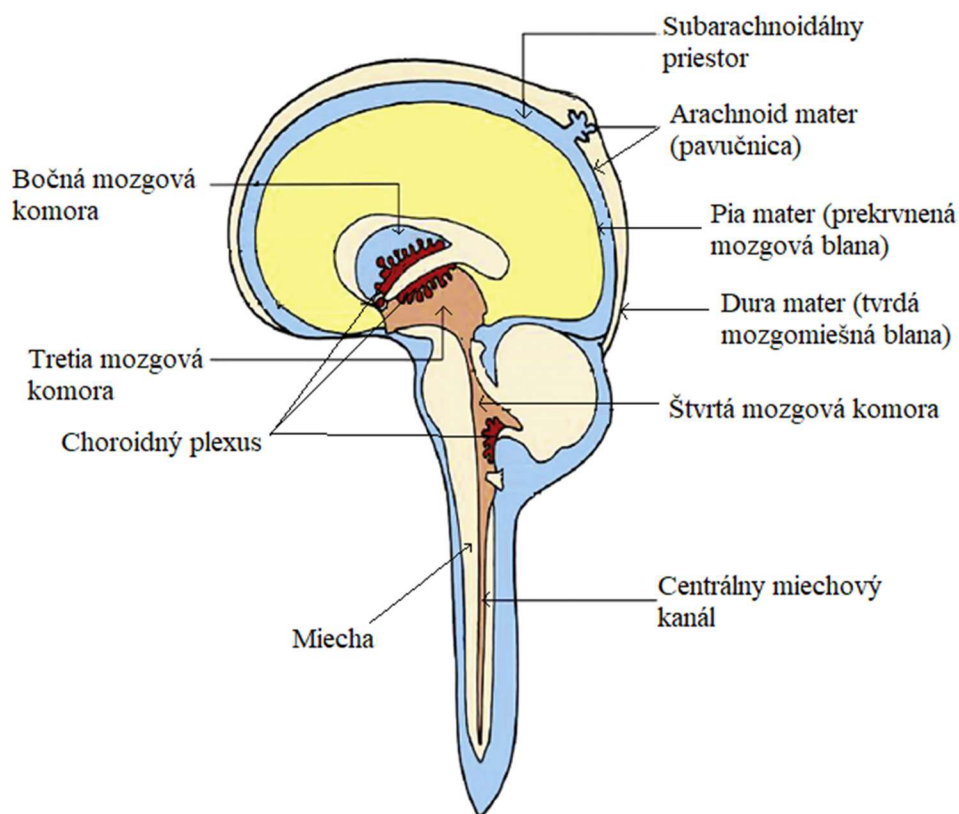
tak isto aj znížené spätné vychytávanie cholínu prostredníctvom jeho transportérov (Sims et al., 1983; Francis, 2005). Okrem toho u pacientov s AD dochádza k poklesu väzbových miest pre Ach, čo značí zmenu v množstve správne fungujúcich nAChR predovšetkým v častiach mozgu (hipokampus a kortex), u ktorých bola už preukázaná neurodegenerácia (Oddo & LaFerla, 2006). Pokles funkcie nAChR môže byť spôsobený väzbou A β 42 peptidu na niektoré z podjednotiek týchto receptorov (Wang et al., 2000; Pettit et al., 2001).



Obr. 6: Metabolizmus acetylcholínu v cholinergných neurónoch.

2.2 Cerebrospinálna tekutina

Cerebrospinálna tekutina (CSF), nazývaná aj likvor alebo mozgovomiešny mok, je číra tekutina bez zápachu. Priemerný objem tejto tekutiny v tele predstavuje asi 150 ml a obmieňa sa trikrát až štyrikrát denne, vzhľadom na rýchlosť produkcie, ktorá je 400-600 ml/deň (Laterra et al., 1999). Z celkového objemu sa 25,5 ml (17 %) nachádza v komorovom systéme mozgu, zvyšných 124,5 ml (83 %) je obsiahnutých v subarachnoidálnom priestore, ktorý sa nachádza medzi dvomi mozgovými blanami (*arachnoid mater* a *pia mater*) (Obr. 7) (Orešković & Klarica, 2011; Sakka et al., 2011).



Obr. 7: Umiestenie zmiených štruktúr v mozgu. Prevzaté a upravené podľa (Le Rhun et al., 2016).

2.2.1 Funkcia

Mozgovomiešny mok ma niekoľko významných funkcií. Jednou z najdôležitejších je transportná funkcia, kedy zabezpečuje prísun živín a odvod spodín metabolizmu buniek mozgu. Dôležitú úlohu zohráva aj pri prenose nervových signálov. Ďalšou významnou funkciou je ochrana mozgu pred zranením, vďaka tomu že systém okolo mozgu, ktorý je naplnený likvorom ma vztlakový účinok (Lattera et al., 1999). Okrem iného táto tekutina zabezpečuje zníženie reálnej hmotnosti mozgu (cca 1,2 kg) na ekvivalent približne 45 g, čím je mozog chránený pred poškodením svojou vlastnou váhou (Spector et al., 2015).

2.2.2 Zloženie

Skoro 99% mozgovomiešneho moku tvorí voda. Zvyšok je tvorený bunkami, elektrolytmi, sacharidmi (Tab. 2), alkoholickými cukrami (Tab. 3), organickými kyselinami (Tab. 4), aminokyselinami (Tab. 5), lipidmi (Tab. 6), proteínmi, nukleozidmi a nukleotidmi, acylkarnitínmi a karnitínom. Okrem iného sú obsiahnuté aj cyklické amidy, vitamíny (Tab. 7), zápalové mediátori, hormóny (Tab. 8), amíny a biogénne amíny a ďalšie (Wester et al., 1999; Irani, 2009; Stoop et al., 2010; Mandal, 2012).

Elektrolyty obsiahnuté v plazme (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , PO_4^{3-} , Cl^- a HCO_3^-), sa nachádzajú aj v likvore. V porovnaní s plazmou je v likvore väčšia koncentrácia Cl^- , Mg^{2+} , avšak menšia koncentrácia Ca^{2+} , Na^+ , K^+ a HCO_3^- (Irani, 2009).

Čo sa týka bunečného zloženia, tak u zdravých jedincov sa množstvo bielych krviniek v CSF môže pohybovať až do 5 leukocytov v 1 μl CSF, pričom zvyčajne ide o T-lymfocyty a monocyty, zodpovedné za imunitné reakcie. Červené krvinky sa v mozgovomiešnom moku u zdravých jedincov nevyskytujú, keďže sa v likvore prirodzene netvoria, nie sú produkované ani v centrálnej nervovej sústave (CNS) a neprechádzajú nepoškodenou hematolikvorovou bariérou (Seehusen et al., 2003). Na druhú stranu môže byť vzorka mozgovomiešneho moku kontaminovaná krvou z ihly, použitou pri jeho odbere pomocou lumbálnej punkcie, a tak je v ňom možné detegovať červené krvinky aj bez patologického výskytu (Seehusen et al., 2003; De Graaf et al., 2011).

Pri fyziologickej hladine glukózy v plazme (3,9-6,7 mmol.l⁻¹) sa koncentrácia glukózy v mozgovomiešnom moku pohybuje okolo 2,5-4,4 mol.l⁻¹. Treba podotknúť, že hladina glukózy v likvore je závislá od jej prítoku z plazmy a zároveň jej metabolického využitia v mozgu a mieche, a jej odtoku do venóznej krvi (Irani, 2009). V CSF sú okrem glukózy obsiahnuté aj iné sacharidy (Tab. 2), alkoholové sacharidy (Tab. 3) aj samotné, všetky v μmol.l⁻¹ jednotkách (Irani, 2009; Stoop et al., 2010; Mandal, 2012).

Tab. 2: Sacharidy v CSF (Irani, 2009; Stoop et al., 2010).

Sacharidy
glukóza
arabinóza
fruktóza
galaktóza
fukóza
manóza
ribóza
sacharóza
xylóza
1,5-anhydro-D-glucitol

Tab. 3: Alkoholové sacharidy v CFS (Irani, 2009; Stoop et al., 2010).

Alkoholové sacharidy
myoinozitol
inozitol
arabitol
sorbitol
ribitol
manitol
galaktikol
1,5-anhyfrosorbitol
glycerol-galaktopyranozid

Organické kyseliny (Tab. 4) sa v CSF vyskytujú v rozsahu koncentrácií od 5 μmol.l⁻¹ do 300 μmol.l⁻¹, okrem kyseliny mliečnej s koncentráciou v jednotkách mmol.l⁻¹ (Stopp et al., 2010; Mandal,2012)

Zloženie aminokyselín (Tab. 5) je v oveľa nižších koncentráciách (μmol.l⁻¹) ako v plazme (1,16-15krát menej). Najväčšie zastúpenie ma glutamín, zatiaľ čo najmenšie majú cysteín, prolín a tryptofán (Irani, 2009).

Tab. 4: Organické kyseliny v CSF (Stoop et.al, 2010).

Organické kyseliny
kyselina 2,3-dihydroxybutánová
kyselina xylonová
kyselina 2,4-dihydroxybutánová
kyselina 2-aminomaslová
kyselina 2-hydroxybutánová
kyselina 2-hydroxyizovalerová
kyselina 3,4-dihydroxybutánová
kyselina 3-hydroxybutánová
kyselina 3-hydroxyizovalérová
kyselina 3-hydroxypropánová
kyselina octová
kyselina acetociová
kyselina akonitová
kyselina askorbová
kyselina pyroglutámová
kyselina pyrohroznová (vrátane jej konjugovanej báze pyruvátu)
kyselina chinová
kyselina citrónová
kyselina erytrónová
kyselina mravčia
kyselina glukónová
kyselina glutámová
kyselina glycerová
kyselina glykolová
kyselina (izo)citrónová
kyselina mliečna (vrátane jej konjugovanej báze laktátu)
kyselina ribónová
kyselina jantárová
kyselina treónová
kyselina močová
kyselina fosforečná

Tab. 5: Aminokyseliny v CSF (Irani, 2009; Stoop et.al, 2010).

Aminokyseliny a ich deriváty
alanín
kyselina asparagová
kyselina glutamová
asparagín
glutamín
arginín
cystein
glycín
leucín
izoluecín
histidín
metionín
fenylalanín
prolín
serín
threonín
tryptofán
tyrozín
valín
citrulín
ornitín
1-metylhistidín
3-metylhistidín

Fosfolipidy, glykolipidy, cholesterol, prostaglandíny, lipoproteíny a mastné kyseliny patria medzi najviac zastúpené skupiny lipidov v mozgovomiešnom moku (Tab. 6). Celková koncentrácia lipidov v CSF sa pohybuje medzi 0,1 a 0,20 g/l (Illingworth & Glover, 1971; Koch et al., 2001; Irani, 2009).

Tab. 6: Lipidy V CSF (Illingworth & Glover, 1971; Koch et al., 2001; Irani, 2009).

Lipidy	
kategória	lipid
fosfolipidy	lysolecitín
	fosfatidylcholín
	sfingomyelín
	fosfatidylozitol
	fosfatidyletanolamin
	kyselina fosfatidová
glykolipidy	cefalín
	monosialotetrahexosylgangliosid (GM1)
	gangliosid GD3
	disialogangliosid-GD1a
	disialogangliosid-GD1b
cholesterol	trisialogangliosid (GT1b)
	tetrasialogangliosid (GQ1b)
prostaglandíny	voľný cholesterol
	esterifikovaný cholesterol
	prostaglandín D2
	prostaglandín E2
lipoproteíny	prostaglandín F2 α
	6- keto-prostaglandín F1 α
mastné kyseliny	Alipoproteín E
	Alipoproteín A-I
	kyselina laurová
	kyselina myristová
	kyselina palmitová
	kyselina stearová
	kyselina linolová
	kyselina linolenová
	kyselina eicosatriénová
	kyselina arachidonová
	kyselina eikosapentaénová
	kyselina dokozapentaénová
kyselina dokosaheptaénová	
kyselina lignocerová	

Koncentrácia bielkovín v mozgovomiešnom moku je asi 200-krát nižšia ako v plazme, kde je ich koncentrácia 65-85 g.l⁻¹. Približne 20 % z týchto bielkovín je syntetizovaná choroidným plexom (napríklad prealbumín), avšak pre niektoré tieto proteíny nie je zanedbateľná ani frakcia prechádzajúca z plazmy (napríklad albumín) (Irani, 2009). Choroidný plexus je vaskularizovaný (tkanivový) orgán, pozostávajúci z epitelových buniek a zo siete kapilár, ktorý sa nachádza v mozgových komorách (Spector & Johanson, 1989). Ďalšie proteíny môžu pochádzať z neurónov a gliových buniek (napríklad tau proteín) alebo sa primárne uvoľňovať z mäkkých mozgových blán (napríklad cystatín C) (Reiber, 2001; Irani, 2009).

Vitamíny v likvore plnia hlavne úlohu antioxidantov a kofaktorov pre biochemické reakcie (Tab. 7). Ich koncentrácie sa pohybujú maximálne do 2 μmol.l⁻¹, okrem vitamínu C, ktorého koncentrácia sa pohybuje okolo 232 μmol.l⁻¹ (Irani, 2009).

Tab. 7: Súhrn vitamínov v CSF (Irani, 2009).

Vitamíny
vitamín A (retinol)
vitamín B1 (thiamin)
vitamín B2 (riboflavin)
vitamín B3 (niacin)
vitamín B5 (kyselina panthetová)
vitamín B6 (pyridoxin)
vitamín B7 (biotín)
vitamín B9 (kyselina listová)
vitamín B12 (kyanokobalamín)
vitamín C (kyselina askorbová)
vitamín D (25-hydroxyvitamín D, 1,25-dihydroxyvitamín D)
vitamín E (α-tokoferol, γ-tokoferol)

Mimo iné v širokom rozsahu koncentrácií (pmol.l^{-1} – mmol.l^{-1}) sa vyskytujú aj hormóny (Tab. 8), ktoré boli detegované v CSF (Irani, 2009).

Tab. 8: Hormóny v CSF (Irani, 2009).

Hormóny	
Rozdelenie	Názov hormónov
systémové hormóny	inzulín, kortizol, hormóny štítnej žľazy, melatonin
adenohypofyzárne hormóny	rastový hormón, prolaktin, thyroid-stimulujúci hormón, luteinizačný hormón, adenokorikotropný hormón
hormóny zadnej hypofýzy	vazopresin, oxytocin
hypotalamus uvoľňujúce faktory	thyreotropin uvoľňujúci hormón, somatostatin, kortikotropin uvoľňujúci hormón

Z nukleozidov sa v likvore nachádza pseudouridín a z nukleotidov adenosíntrifosfát, guanosíntrifosfát, cyklický adenosínmonofosfát a cyklický guanosínmonofosfát, avšak všetky v nízkych hladinách pod 1 nm.l^{-1} (Irani, 2009, Stoop et al., 2010).

Acylkarnitíny (acetyl L-karnitín, propionyl-L-karnitín, butyryl-L-karnitín, hydroxypropionyl-L-karnitín, valeryl-L-karnitín) sú v likvore detegované do $1 \text{ } \mu\text{mol.l}^{-1}$. Voľný L-karnitín sa vyskytuje v koncentrácií cez $1 \text{ } \mu\text{mol.l}^{-1}$ (Mandal et al., 2012).

V zdravom mozgovomiešnom moku sa v nízkych koncentráciách (pg/ml) nachádzajú mnohé rozpustné zápalové mediátory zahŕňajúce: cytokíny, protilátky, proteíny komplementu, chemokíny (Irani, 2009).

V rozsahu jednotiek až desiatok $\mu\text{mol.l}^{-1}$ sa v likvore vyskytujú kreatín, kreatinín, spermín, spermidín, pestrucín, fosforyletanolamín a dimetylamín. Močovina je v jednotkách mmol.l^{-1} . Tieto zlúčeniny patria medzi amíny (Marton et al., 1974; Stoop et al., 2010; Mandal, 2012).

Medzi biogenné amíny nachádzajúce sa v CSF patria (Wester et al., 1990):

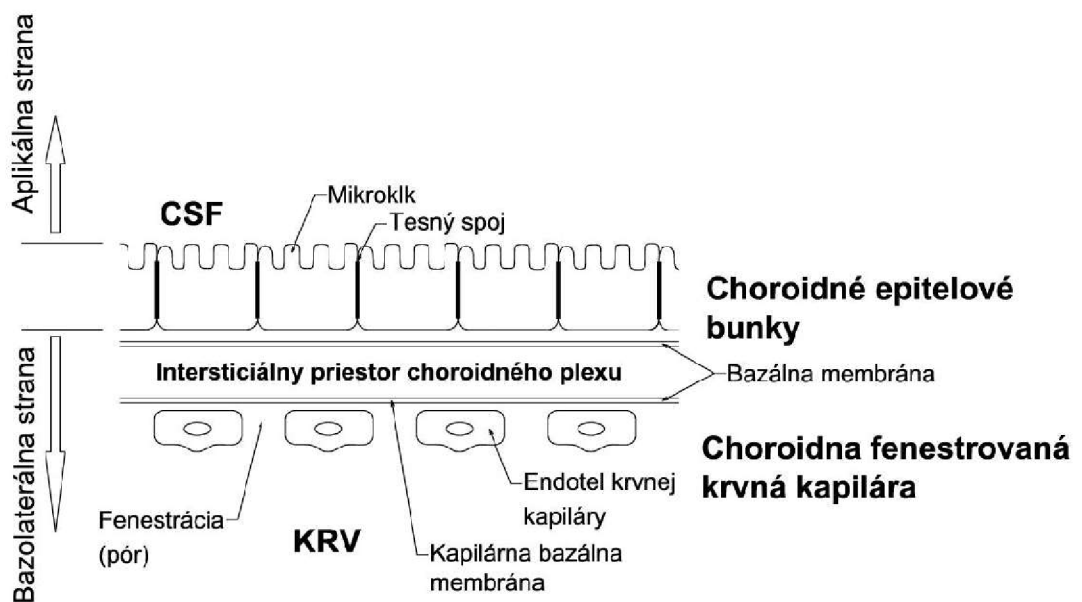
- dopamín a jeho metabolity 3-metoxytyramín a kyseliny homovanilová
- sérotonín a jeho metabolit kyselina 5-hydroxyindolactová
- noradrenalín a jeho metabolity normetanefrín a 3-metoxy-4-hydroxyfenylglykol

Okrem už opísaných zložení, môžeme v cerebrospinalnej tekutine ešte detegovať: 1-monopalmitoylglycerol, 1-monostearoylglycerol, acetón, acetylcholin, sn-glycerol-3-fosfát, trimetylamín-N-oxid, xantín (Irani, 2009; Stoop et al., 2010).

2.2.3 Hematolikvorová bariéra

Tento termín sa používa pre bariéru oddeľujúcu krv a mozgovomiešny mok (Obr. 8). Z bazolaterálnej strany je tvorená: vrstvou choroidných fenestrováných (pórovitých) kapilár - cez ktoré krv preteká a filtruje sa, dvomi bazálnymi membránami - medzi ktorými sa nachádza intersticiálny priestor choroidného plexu. Ďalšou vrstvou sú samotné choroidné epitelové bunky. Aplikálna strana má zväčšený povrch prítomnosťou výčnelkov (mikroklkov) (Spector & Johanson, 1989; Solár et al., 2020).

Hlavnými funkciami tejto bariéry sú tvorba fyzickej bariéry pre prechod látok medzi krvou a likvorom, obsah transportných proteínov umožňujúcich vstup živín z krvi a vylučovanie odpadových látok z likvoru (Irani, 2009).

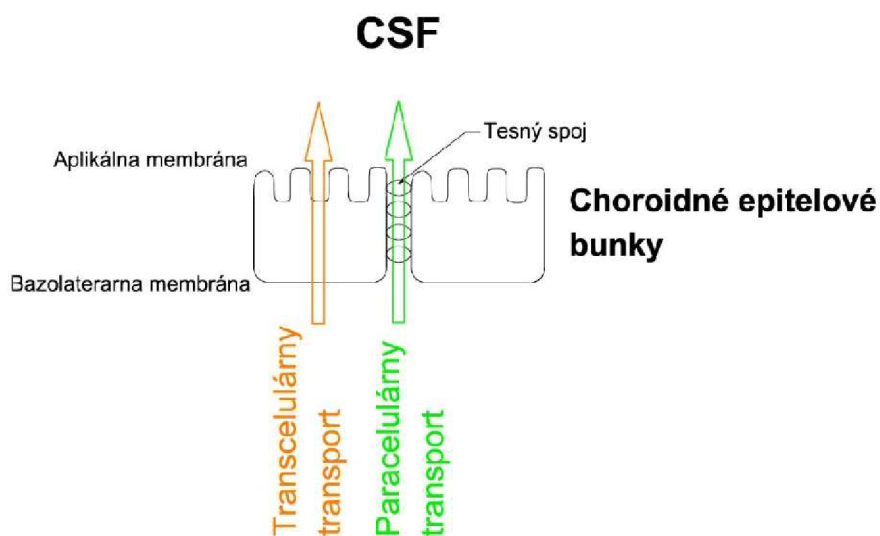


Obr. 8: Stavba hematolikvorovej bariéry.

2.2.4 Transport látok cez hematolikorovú bariéru

Transport látok cez hematolikorovú bariéru je hlavne v smere z krvi do CSF. Avšak niektoré látky sa transportujú v opačnom smere, čo zabezpečuje ich odstraňovanie (napríklad: metabolity neurotransmiterov, niektoré liečivá, anorganické ióny) z likvoru (Tumani et al., 2018).

Vďaka fenestráciám krvných kapilár sa môže väčšina molekúl a rozpustených látok, do rozmeru 12 nm alebo molekulovej hmotnosti 800 kDa, dostávať z krvi pasívnou difúziou až k choroidným epitelovým bunkám. Transport cez choroidné epitelové bunky je vysoko regulovaný, pričom súčasne prebiehajú dva transporty: paracelulárny a transcelulárny (Obr. 9) (Praetorius & Damkier, 2017).



Obr. 9: Znáznornenie dvoch typov transportu látok z krvi do CSF cez hematolikorovú bariéru.

2.2.4.1 Paracelulárny transport

Paracelulárny transport sa vyskytuje medzi choroidnými epitelovými bunkami, pričom látky a molekuly musia prechádzať cez tesné spoje medzi týmito bunkami. V tesných spojoch sa nachádzajú kladiny a proteíny ktoré sú zodpovedné za kontrolu paracelulárnej permeability a zabraňujú voľnému transportu väčšiny látok a molekúl, prejdú iba tie so správnou veľkosťou a nábojom. Voda, K^+ a Na^+ sú jednými z mála molekúl, ktoré sú schopné využívať paracelulárny transport (Praetorius & Damkier, 2017).

2.2.4.2 Transcelulárny transport

Transcelulárny transport sa uskutočňuje z krvi cez bazolaterálnu a následne aplikálnu membránu choroidnej epitelovej bunky až do CSF (Johanson et al., 2011). Transcelulárny transport môže byť pasívnou difúziou, endocytózou, vezikulami alebo prostredníctvom prenášačov (Saunders et al., 2013; Morris et al., 2017).

Endocytóza môže byť spôsobená prítomnosťou špecifických receptorov, ako napríklad transtyretínový receptor alebo inzulinový receptor. Vezikulárny transport je sprostredkovaný membránovými proteínmi spojenými s vezikulami (Saunders et al., 2013; Morris et al., 2017).

Prenášače môžeme rozdeľovať na influxné, efluxné a obojsmerné. Influxné sprostredkujú príjem substrátov do choroidnej epitelovej bunky a efluxné naopak odtok substrátov z choroidnej epitelovej bunky. Hlavnými influxnými transportérmi sú nadrodina transportérov nosičov rozpustených látok (SLC), avšak niektoré transportéry SLC fungujú aj obojsmerne alebo efluxne. Transportéry SLC nepotrebujú byť poháňané ATP. Na druhú stranu typickými efluxnými prenášačmi sú nadrodina ATP-viažúca kazetu (ABC), ktoré sú poháňané ATP (Morris et al., 2017).

SLC je nadrodina s 65 rodinami a približne 395 individuálnymi transportnými génmi. Avšak v epitelovej bunke choroidného plexu boli identifikované iba niektoré rodiny, ako sú napríklad: SLC2, SLC7, SLC15, SLC16, SLC22. Sprostredkujú transport hydrofilných alebo vysoko polarizovaných látok ako napríklad: aminokyseliny, organické anióny a kationy, peptidy, vitamíny, monosacharidy, purínové a pyrimidinové bázy (Liddelow, 2015; Morris et al., 2017; <http://slc.bioparadigms.org/>, citované 15.12.2022).

Transportéry nadrodiny ABC sú klasifikované do siedmich rodín (A-G) na základe organizácie a homológie aminokyselín. Rodiny vyskytujúce sa v choroidných epitelových bunkách sú ABCB, ABCC a ABCG. Ich hlavnou funkciou je selektívne prenášať mnohé substráty proti koncentračnému gradientu cez choroidné epitelové bunky (Saunders et al., 2013; Morris et al., 2017).

Medzi hlavné ABC transportéry, prítomné v týchto bunkách, patria: transportéry P-glykoproteínu (Pgp) a proteíny multidrogovej rezistencie (MRP). Pgp sa nachádza na aplikálnej membráne choroidných buniek a slúži na odstraňovanie látok a xenobiotík ako napríklad: aldosterón, kortizol, ritonavir, aktinomycín D, verapamil z CSF. MRP sa vyskytujú na oboch membránach choroidnej epitelovej bunky. MRP vyskytujúce sa na bazolaterálnej membráne zabezpečujú najmä odstránenie látok a xenobiotík z choroidnej epitelovej bunky do krvi. Medzi takéto substráty patria: konjugované steroidy, žľčové kyseliny, nekonjugovaný bilirubín, prostaglandíny, antiretrovírusové látky, tauroolithocholát 3-sulfát, tiopurínmonofosfáty, nukleotidové analógy, 9-(2-fosfonometoxyetyl) adenín, tiopurínmonofosfáty, glukuronozylsulfid a ďalšie. Ďalej MRP zabraňujú vstupu iónov ťažkých kovov a toxínom do CSF (Rao et al., 1999; Delange et al., 2004; Morris et al., 2017).

Okrem nich sa transportéry z rodín ABCG a ABCA podieľajú na prenose cholesterolu z choroidnej epitelovej bunky do CSF (cez bazolaterálnu membránu do bunky bol cholesterol transportovaný prostredníctvom receptorov ako sú: proteín 1 súvisiaci s lipoproteínovým receptorom, proteín 2 súvisiaci s lipoproteínovým receptorom alebo receptor apolipoproteínu E2) (Pifferi & Plourde, 2021).

Existujú aj iné prenášače, napríklad proteínové, ktoré špecificky cielia na proteínové triedy alebo priamo na jednotlivé proteíny a transportujú ich cez epitelovú choroidnú bunku. Napríklad albumín je transportovaný špecifickým prenášačom SPARC (albumín viažuci transportér) (Saunders et al., 2013).

Pre ióny sa na bazolaterálne membrány choroidných buniek nachádzajú Na^+/H^+ prenášače, $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ prenášače a Na^+ -dependentné výmenníky Cl^- s HCO_3^- . Cez aplikálnu membránu môžu ióny prechádzať aktívnym transportom zabezpečeným Na^+/K^+ ATPasou, kotransportermi $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$, KCl a NaHCO_3 . Popríklad niektoré ióny (K^+ , Cl^- , HCO_3^-) môžu cez aplikálnu membránu difundovať (po gradientovom spáde)

prostredníctvom špecifických iónových kanálov (Laterra et al., 1999; Johanson et al., 2011).

Transport vody cez epitelové bunky choroidného plexusu zabezpečuje Akvaporín-1, kanál podporujúci osmotický tok vody (Johanson et al., 2011).

2.2.5 Lumbálna punkcia

Odber mozgovomiešneho moku sa vykonáva lumbálnou punkciou. Ide o invazívnu metódu, ktorá zahŕňa zavedenie atraumatickej (ihla so zaobleným koncom), 9 cm dlhej ihly pod ukončenie miechy (medzi lumbálne stavce L₃ - L₄), prechod cez *dura mater* (tvrdá mozgovomiešná blana) a umožnenie prístupu do subarachnoidálneho priestoru, kde sa vyskytuje likvor. Pacient by sa mal nachádzať v polohe na boku s kolenami ohnutými k hrudi, v niektorých prípadoch je možné vykonať tento zákrok aj v sede. Najčastejším problémom pri nesprávnom výkone lumbálnej punkcie môže byť kontaminácia vzorky krvou (Doherty, 2014).

2.3 Metabolomika a lipidomika

Oliver Fiehn (2002), prvý krát definoval metabolomiku ako vedný obor pre štúdium metabolitov. Uviedol, že metabolomika, by mohla byť dobrým nástrojom pre skúmanie príčin biologických účinkov organizmov (patogénov) na iné vyššie organizmy (napríklad rastliny) (Fiehn, 2002). Pojem lipidomika, odbor vyvinutý z metabolomiky, bol definovaný v roku 2003, kedy Han a Gross (2003) boli medzi prvými, ktorí tento pojem použili. Metabolomika je vedným oborom zaoberajúcim sa metabolómom, zatiaľ čo lipidomika sa zaoberá štúdiom lipidómu. Ich cieľom je zistiť výskyt a organizáciu metabolitov/lipidov, ich biologickú úlohu a biochemické mechanizmy vzájomnej interakcie v bunke za fyziologických aj patologických stavov (Han & Gross, 2003; Li-Biesson, 2016).

Metabolóm predstavuje súbor malých endogénnych a exogénnych molekúl s molekulovou hmotnosťou menšou ako 1 kDa, nazývaných metabolity. Metabolity sú látky (substráty, medziprodukty a produkty) tvorené a využívané v rámci metabolizmu bunky daného organizmu (Villas-Bôas, 2007; Roberts, 2012). Doposiaľ bolo celkovo identifikovaných 248079 metabolitov, pričom 450 z nich bolo detegovaných okrem iného aj v mozgovomiešnom moku zdravých jedincov aj pacientov s rôznymi patologickými zmenami (<https://hmdb.ca/>, citované 14.4.2023).

Lipidóm, podskupina metabolómu, je súbor všetkých lipidov. Lipidy sú molekuly do 1500 Da s hydrofóbnym alebo amfifílnym charakterom, ktoré sa nachádzajú vo všetkých živých organizmoch (Colsch et al., 2015; Holčapek et al., 2018). Lipidy rozdeľujeme do ôsmich kategórií: voľné mastné kyseliny, glycerolipidy, glycerolfosfolipidy, sfingolipidy, sacharolipidy, polyketidy, sterolové lipidy, prenol lipidy. Doposiaľ bolo identifikovaných približne 47876 lipidov zo všetkých tried (<https://www.lipidmaps.org/>, citované 14.4.2023). Amfifílny charakter majú napríklad sfingolipidy, glycerolfosfolipidy, a ďalšie lipidy, ktoré sa skladajú z polárnych hlavných skupín a nepolárnych mastných acylových reťazcov (Holčapek et al., 2018). Lipidy majú veľa rozmanitých funkcií v organizmoch. Môžu pôsobiť ako signálne molekuly (napríklad fosfoinozitidy a fosfatidylinozitol 4,5-bisfosfát), byť stavebnými zložkami membrán (najmä glycerolfosfolipidy, sfingolipidy), pôsobia ako tepelné izolátory, rozpúšťadla hydrofóbných látok (prijímaných z potravy, napríklad vitamíny rozpustné v tukoch), zásobárne energie a majú ochrannú funkciu (chránia niektoré orgány pred mechanickým poškodením, tým že ich obalujú) (Kmeťová et al., 2011; Li-Biesson, 2016).

Metabolomika a lipidomika sa uplatňujú v medicíne, toxikológii, farmakológii, epidemiologických a environmentálnych štúdiách. Ako biologický materiál sa používajú biologické tekutiny (krv, moč, sliny, pot, CSF, výkaly, dych, semenná plazma, žlč a ďalšie), tkanivá, bunky alebo celé organizmy (Nalbantoglu, 2019).

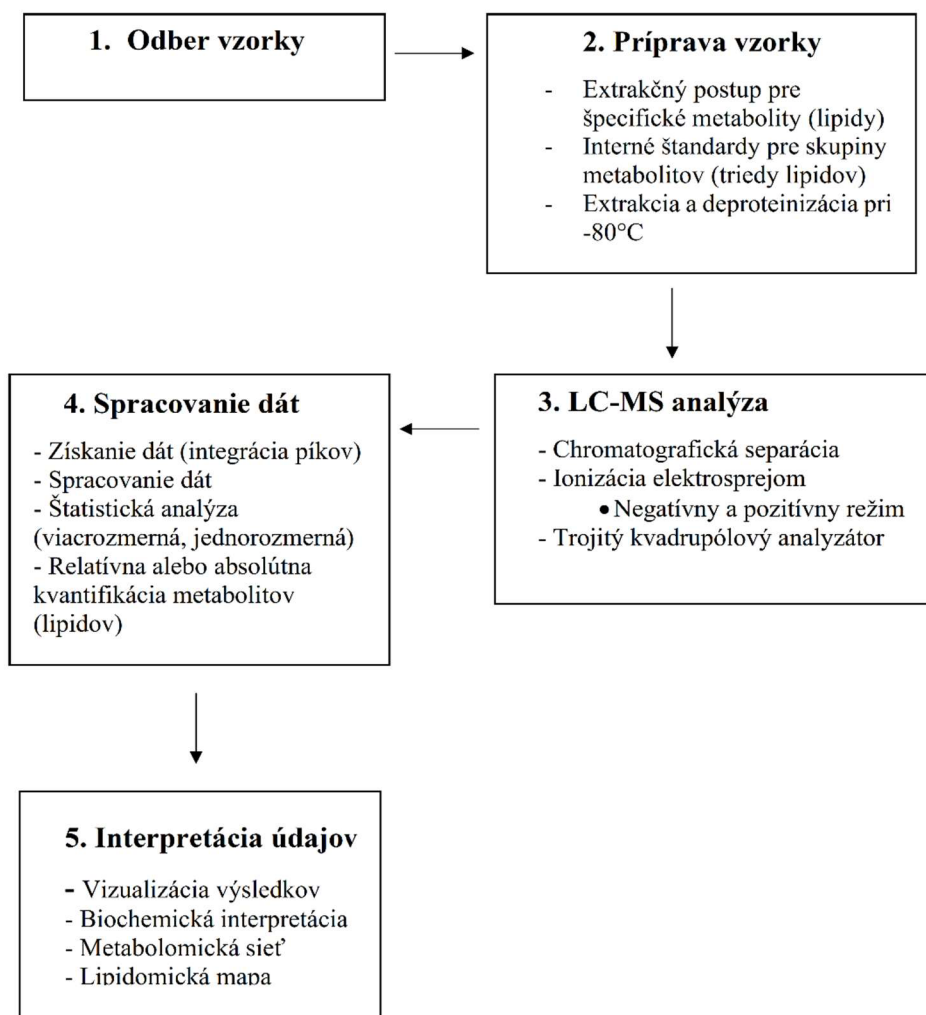
Tieto vedné obory majú niektoré výhody oproti ostatným omickým vedám, genomike, transkriptomike a proteomike. Metabolity aj lipidy sú veľmi náchylné na vonkajšie aj vnútorné zmeny a poskytujú informácie o tom, čo sa deje na metabolickej a fyziologickej úrovni organizmu v daný čas. Medzi ďalšie výhody patrí jednoduchšia príprava vzoriek alebo rýchlosť analýz (Alfaro & Young, 2018).

Na druhú stranu medzi nevýhody patrí nedostatok komplexných prístupov, ktoré by boli schopné analyzovať celý metabolóm (lipidóm). S tým súvisí potrebná optimalizácia metabolomických (lipidomických) metód, ktorú si vyžaduje detekcia metabolitov (lipidov), prítomných v rôznych organizmoch a biologických materiáloch, vyskytujúcich sa v širokom rozpätí koncentrácií a polarít (Álvarez-Sánchez et al., 2010).

Dvomi hlavnými metabolomickými (lipidomickými) stratégiami sú necielená a cieľená metabolomika (lipidomika). Necielený prístup slúži predovšetkým na kvalitatívnu analýzu metabolitov (lipidov), ktoré sú prítomné v skúmanom materiáli. Síce týmto prístupom je možné detegovať viac metabolitov (lipidov), tým zisťovať nové metabolické (lipidové) markery v organizme a vďaka tomu formovať nové hypotézy, ale tento prístup je menej citlivý a spracovanie dát a následná identifikácia metabolitov (lipidov) trvajú dlhšie oproti cieľenej analýze (Čajka & Fiehn, 2016).

Naopak cieľený prístup sa zameriava iba na dopredu zvolené metabolity (lipidy), ktorých prítomnosť a množstvo je potom zisťované vo vzorke. Táto analýza potom slúži k charakterizácii zmien spojených s patobiochémiou ochorení (Balazy, 2004; Contrepolis et al., 2018).

Na analýzu pri metabolomike aj lipidomike je dnes najčastejšie využívaná hmotnostná spektrometria (MS). Ide o vysoko citlivú, ale deštruktívnu metódu. V cieľených prístupoch sa používa hlavne tandemové usporiadanie: trojitý kvadrupólový analyzátor, ktorý je schopný monitorovať molekulové reakcie, takzvané prechody, pri ktorých sa materský ión pôvodnej molekuly fragmentuje v zrážkovej cele a sleduje sa jeho fragmentový ión. Materský ión a fragmentový ión sú špecifické pre príslušný metabolit (lipid). Najčastejšie používanou metódou na ionizáciu je elektrosprejová ionizácia (ESI) a najbežnejšiu separačnou technikou v spojení MS v metabolomike (lipidomike) je hlavne kvapalinová chromatografia (LC). Najviac používaným režimom pre lipidomiku je LC s reverznou fázou, po ňom nasleduje hydrofilná interakčná chromatografia (HILIC). V metabolomickej analýze je častá HILIC separácia pomocou aminopropyllovej kolóny. Pracovný postup metabolomiky (lipidomiky) však začína odberom vzoriek a ich prípravou, nasleduje samotná analýza a končí to spracovaním dát, vrátane ich interpretácie (Obr. 10) (Čajka & Fiehn, 2016; Holčapek et al., 2018).



Obr. 10: Pracovný postup cieľenej metabolomickej (lipidomickej) analýzy, ktorý bol mimo iné aj použitý v rámci tejto diplomovej práce.

V metabolomike je využívaná aj nukleárna magnetická rezonancia (NMR), ktorá je síce nedeštruktívna metóda a nepotrebuje byť spojená so separačnými technikami, ale je málo citlivá (Lindon et al., 2007). V metabolomike aj lipidomike boli tiež často používanými technikami plynová chromatografia a tenkovrstvová chromatografia, ktoré sa dodnes ešte používajú (Čajka & Fiehn, 2016; Holčapek et al., 2018).

3 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

3.1 Materiál a vybavenie

3.1.1 Biologický materiál

Pre túto diplomovú prácu boli použité vzorky mozgovomiešneho moku. Celkom sa jednalo o 36 vzoriek, pričom 16 vzoriek bolo od pacientov s Alzheimerovou chorobou (11 žien a 5 mužov) a 20 vzoriek bolo od jedincov bez neurologického ochorenia (8 žien a 12 mužov), ktoré boli použité ako kontrolné vzorky. Vzorky boli získané od spoločnosti PrecisionMed (Carlsbad, Kalifornia, USA). Kompletné klinické údaje o testovaných subjektoch sú v Prílohe 1.

3.1.2 Chemikálie

Voda (H₂O), acetonitril (ACN), metanol (MeOH), izopropanol (IPA): všetky o LC-MS čistote a zakúpené od firmy Sigma-Aldrich (Saint Louis, Missouri, USA). Kyselina octová, hydroxid amónny, octan amónny zakúpené taktiež od firmy Sigma-Aldrich (Saint Louis, Missouri, USA). Kalibračné pH roztoky s pH 7 a pH 10 (Hamilton Company, Domat/Ems, Švajčiarko) Interné štandardy pre metabolomickú analýzu (Tab. 9): LEU_d3 a C4_d3 (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA), kreatín_d3 (C/D/N Isotopes Inc., Pointe-Claire, Quebec, Canada). Interné štandardy pre lipidomickú analýzu: zmes interných štandardov SPLASH® LIPIDOMIX® Mass Spec Standard (Tab. 10), C15 Ceramid (d7) (d18:1-d7/15:0) a FA_18:1_d9 (Tab. 9). Všetky inertné štandardy pre lipidomickú analýzu boli zakúpené od firmy Avanti Polar Lipids (Alabaster, Alabama, USA).

Tab. 9: Použité interné štandardy (okrem zmesi SPLASH® LIPIDOMIX® Mass Spec Standard) pre metabolomickú a lipidomickú analýzu.

Celý názov	Skrátený názov	Sumárny vzorec	Koncentrácia zásobného roztoku	Koncentrácia v extrakčnom činidle
L-Leucin-5,5,5-d3	LEU_d3	C ₆ D ₃ H ₁₀ NO ₂	10 mmol.l ⁻¹	2 μmol.l ⁻¹
Butyryl-L-karnitín-(N-metyl-d3)	C4_d3	C ₁₁ D ₃ H ₁₈ NO ₄	5 mmol.l ⁻¹	0,2 μmol.l ⁻¹
Creatine-d3 H ₂ O (methyl-d3)	kreatín_d3	C ₄ H ₆ D ₃ N ₃ O ₂ .H ₂ O	20 mmol.l ⁻¹	2 μmol.l ⁻¹
N-pentadekanoyl-D-erythro-sfingozín (d7) kyselina	C15 Ceramid-d7 (d18:1-d7/15:0)	C ₃₃ H ₅₈ D ₇ NO ₃	1 mg.ml ⁻¹	1 μmol.l ⁻¹
(15,15,16,16,17,17,18,18,18-d9) olejová	FA_18:1_d9	C ₁₈ H ₂₅ D ₉ O ₂	3 mmol.l ⁻¹	0,1 μmol.l ⁻¹

Tab. 10: Zloženie zmesi interných štandardov SPLASH® LIPIDOMIX® Mass Spec Standard.

Celý názov	Skrátený názov	Sumárny vzorec	Celková koncentrácia v zmesi ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)	Celková koncentrácia v extrakčnom činidle ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)
1-pentadekanoyl-2-oleoyl(d7)-sn-glycero-3-fosfocholín	15:0-18:1(d7) PC	$\text{C}_{41}\text{H}_{73}\text{D}_7\text{NO}_8\text{P}$	160	8
1-pentadekanoyl-2-oleoyl(d7)-sn-glycero-3-fosfoetanolamín	15:0-18:1 (d7) PE	$\text{C}_{38}\text{H}_{67}\text{D}_7\text{NO}_8\text{P}$	5	0,25
1-pentadekanoyl-2-oleoyl(d7)-sn-glycero-3-fosfo-L-serín (sodná soľ)	15:0-18:1 (d7) PS	$\text{C}_{39}\text{H}_{66}\text{D}_7\text{NNaO}_{10}\text{P}$	5	0,25
1-pentadekanoyl-2-oleoyl(d7)-sn-glycero-3-[fosfo-rac-(1'-glycerol)] (sodná soľ)	15:0-18:1 (d7) PG	$\text{C}_{39}\text{H}_{67}\text{D}_7\text{NaO}_{10}\text{P}$	30	1,5
1-pentadekanoyl-2-oleoyl(d7)-sn-glycero-3-fosfoinozitol (amónna soľ)	15:0-18:1 (d7) PI	$\text{C}_{42}\text{H}_{75}\text{D}_7\text{NO}_{13}\text{P}$	10	0,5
1-pentadekanoyl-2-oleoyl(d7)-sn-glycero-3-fosfát (sodná soľ)	15:0-18:1-(d7)-PA	$\text{C}_{36}\text{H}_{61}\text{D}_7\text{NaO}_8\text{P}$	7	0,35
1-oleoyl(d7)-2-hydroxy-sn-glycero-3-fosfocholín	18:1 (d7) LPC	$\text{C}_{26}\text{H}_{45}\text{D}_7\text{NO}_7\text{P}$	25	1,25
1-oleoyl(d7)-2-hydroxy-sn-glycero-3-fosfoetanolamín	18:1 (d7) LPE	$\text{C}_{23}\text{H}_{39}\text{D}_7\text{NO}_7\text{P}$	5	0,25
cholest-5-én-3b-yloléát-d7	18:1 (d7) CE	$\text{C}_{45}\text{H}_{71}\text{D}_7\text{O}_2$	350	17,5
1-oleoyl(d7)-rac-glycerol	18:1 (d7) MG	$\text{C}_{21}\text{H}_{33}\text{D}_7\text{O}_4$	2	0,1
1-pentadekanoyl-2-oleoyl(d7)-sn-glycerol	15:0-18:1 (d7) DG	$\text{C}_{36}\text{H}_{61}\text{D}_7\text{O}_5$	10	0,5
1,3-dipentadekanoyl-2-oleoyl(d7)-glycerol	15:0-18:1(d7)-15:0 TG	$\text{C}_{51}\text{H}_{89}\text{D}_7\text{O}_6$	55	2,75
N-oleoyl(d9)-D-erythro-sfingozylfosforylcholín	18:1 (d9) SM	$\text{C}_{41}\text{H}_{72}\text{D}_9\text{N}_2\text{O}_6\text{P}$	30	1,5
Cholesterol-d7	Cholesterol (d7)	$\text{C}_{27}\text{H}_{39}\text{OD}_7$	100	5

3.1.3 Prístroje a vybavenie

Vortex (Argolab, Carpi MO, Taliansko), centrifúga HERMLE Z 216 MK (HERMLE Labortechnik GmbH, Wehingen, Rakúsko), pH meter Orion star A111 (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA), analytická váha AND-HR120 (A&D, Ann Arbor, Michigan, USA), kvapalinový chromatograf Exion LC (Sciex, Framingham, Massachusetts, USA), hmotnostný spektrometer QTRAP 6500+ (Sciex, Framingham, Massachusetts, USA), kolóna pre metabolomickú analýzu NH₂ Luna® (2 x 100 mm; 3 µm) (Phenomenex, Torrance, USA), kolóna pre lipidomickú analýzu ACQUITY BEH® (2.1 x 100 mm, 1.7 µm) (Waters, Milford, MA, USA).

3.1.4 Programy

Analyst softvér (verzia 1.7.3), Sciex-OS (verzia 2.0), GraphPad Prism (verzia 9.0) RStudio (verzia 4.0.3), SIMCA softvér® (verzia 17.0), Cytoscape softvér (verzia 3.9.1).

3.2 Metódy

3.2.1 Príprava extrakčného činidla

Pre metabolimickú štúdiu bolo pripravené 25 ml extrakčného činidla, zloženého z metanolu a interných štandardov: LEU_d3, C4_d3 a kreatín_d3 s výslednými koncentráciami uvedenými v Tab. 9. Pre lipidomickú štúdiu bolo použité 20 ml izopropanolového extrakčného činidla opäť s internými štandardmi: C15 Ceramid-d7 (d18:1-d7/15:0), FA_18:1_d9 s finálnymi koncentráciami zaznamenanými v Tab. 9 a 5% zmesi SPLASH LIPIDOMIX® so zložením zapísaným v Tab. 10.

3.2.2 Extrakcia metabolitov a lipidov

Vzorky pre metabolomickú štúdiu boli najskôr pomaly rozpustené na ľade. Následne boli vortexované a 10 µl bolo prepipetované do čistej mikroskúmavky. K mozgovomiešnému moku bolo pridané 40 µl metanolového extrakčného činidla a zmes bola vortexovaná 30 sekúnd. Mikroskúmavky s pripraveným roztokom boli následne vložené do mrazničky (-80°C) na noc, aby došlo k deproteinizácií.

Na druhý deň boli vzorky opäť zvortexované. Následne boli vložené na 15 minút do centrifúgy pri 4°C a 15000 otáčkach/minútu. Potom bolo z každej vzorky odpipetované 35 µl supernatantu do sklenenej vialky.

Extrakcia pre lipidomickú štúdiu bola prevedená rovnakým spôsobom s rozdielom v extrakčnom činidle.

3.2.3 Vzorka kontroly kvality (QC)

QC vzorka bola vytvorená tak, že z každej pripravenej vzorky boli po centrifugácii odpipetované 3 μl do jednej mikroskúmavky. Následne bola zmes QC vzorky rozdelená do šiestich alikvotov, ktoré boli rozmiestnené medzi vzorky pacientov a kontrol pre kontrolovanie priebehu kvality analýz a následné spracovanie vzoriek a štatistickú analýzu. Pre metabolomickú a lipidomickú štúdiu boli QC vzorky pripravené zvlášť.

3.2.4 Príprava mobilných fáz

Pre metabolomickú analýzu bolo na prípravu mobilnej fáze A (20 mmol.l^{-1} octan amónny, pH 9,75) do litra vody pridané 1140 μl koncentrovanej kyseliny octovej. Následne bola vykonaná kalibrácia pH metra, za použitia certifikovaných roztokov o pH 7,0 a pH 10,0. K vode s kyselinou octovou bol za stáleho miešania a merania pH pridávaný hydroxid amónny do požadovaného pH 9,75. Ako mobilná fáza B bol použitý 100% acetonitril.

Na prípravu mobilných fáz A a B pre lipidomickú analýzu bolo potrebné, pre každú zvlášť, navážiť 0,77082 g octanu amónneho, pre dosiahnutie koncentrácie 10 mmol.l^{-1} . Mobilná fáza A bola pripravená zmiešaním acetonitrilu s vodou v pomere 60:40. K takémuto roztoku bol pridaný navážený octan amónny. Mobilná fáza B bola pripravená zmiešaním izopropanolu s acetonitrilom v pomere 90:10 a pridaním naváženého octanu amónneho.

3.2.5 Kvapalinová chromatografia s tandemovou hmotnostnou spektrometriou

Vzorky boli pred analýzou náhodne zoradené a QC alikvoty boli rozmiestnené po každej šiestej skutočnej vzorke.

Cielená metabolomická a lipidomická analýza boli uskutočnené pomocou vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie spojenej s tandemovou hmotnostnou spektrometriou (LC-MS/MS, systém ExionLC/QTRAP 6500+). Ionizácia prebiehala pomocou elektrospreja (ESI) v pozitívnom a negatívnom móde pomocou funkcie prepínania polarity behom analýzy. Detekcia metabolitov a lipidov bola uskutočnená prostredníctvom plánovaného monitorovania viacerých reakcií (scheduled MRM), prostredníctvom ktorého bolo možné monitorovať viacej prechodov (m/z molekulového

iónu/ m/z produktového iónu – Q1/Q3) v rámci jednej analýzy. Počet MRM prechodov bol rovný počtu meraných metabolitov/lipidov.

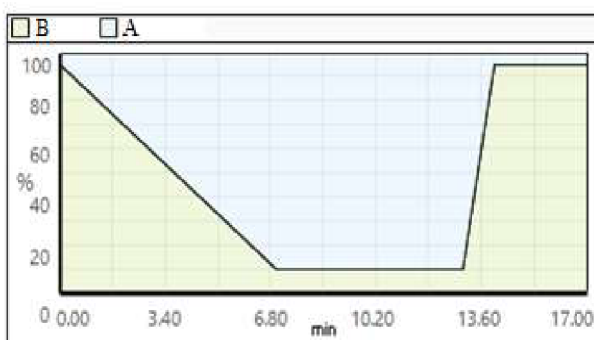
Podmienky a nastavenie LC-MS/MS pre ciele metabolomickú analýzu sú zhrnuté v Tab. 11. Analýza trvala 17 minút a separácia prebiehala na základe hydrofilných interakcií aminopropylovej kolóny NH₂ Luna® (2,0 x 100 mm; 3,0 μm). Gradientová elúcia je naznačená v Tab. 12 a Obr. 11. Priebeh analýzy bol kontrolovaný pomocou softvéru Analyst.

Tab. 11: Parametre LC-MS/MS pre metabolomickú štúdiu

LC	
nástrek	1 μl
prietok	0.30 ml/min
teplota kolóny	35 °C
mobilná fáza A	20 mmol.l ⁻¹ octan amónny, pH 9,75
mobilná fáza B	ACN (100%)
MS/MS	
napätie iónového spreja	+/- 4500 V
plynná kolóna	40 psi
teplota zdroja	400 °C
počet MRM prechodov	≈ 200

Tab. 12: Elúčny gradient pre metabolomickú štúdiu

Čas [minúta]	Pomer mobilnej fáze A [%]	Pomer mobilnej fáze B [%]
0,00	5	95
7,00	90	10
13,00	90	10
14,00	5	95
17,00	5	95



Obr. 11: Elúčny gradient pre metabolomickú štúdiu

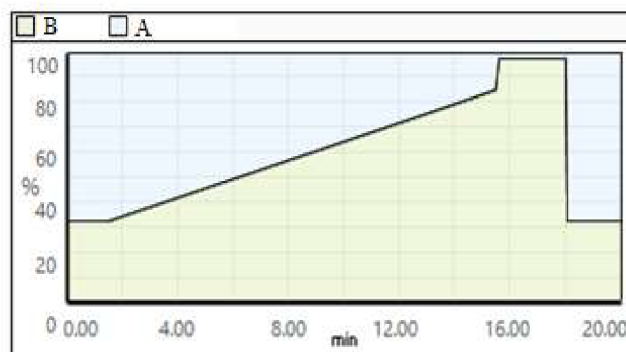
Cielená lipidomická analýza trvala 20 minút, pričom separácia sa uskutočňovala pomocou reverznej fáze kolóny C8 ACQUITY BEH® (2.1 x 100 mm, 1.7 µm) na základe hydrofóbných interakcií. Parametre a podmienky LC-MS/MS sú opäť zhrnuté v Tab. 13. Gradientová elúcia je naznačená v Tab. 14 a Obr. 12.

Tab. 13: Parametre LC-MS/MS pre lipidomickú analýzu

LC	
nástrek	1 µl
prietok	0.35 ml/min
teplota kolóny	55 °C
mobilná fáza A	ACN/H ₂ O (60:40) + 10 mmol.l ⁻¹ octanu amónneho
mobilná fáza B	IPA/ACN (90:10) + 10 mmol.l ⁻¹ octanu amónneho
MS/MS	
napätie iónového spreja	+/- 4500 V
plynná kolóna	40 psi
teplota zdroja	400 °C
počet MRM prechodov	972

Tab. 14: Gradientová elúcia pre lipidomickú štúdiu

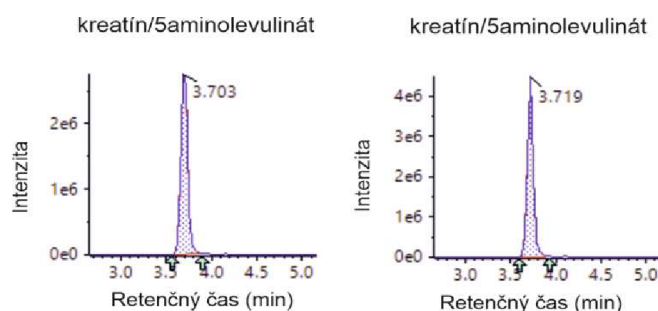
Čas [minúta]	Pomer mobilnej fáze A [%]	Pomer mobilnej fáze B [%]
0,0	68	32
1,5	68	32
1,5	15	85
15,6	3	97
18,0	3	97
18,1	68	32
20,0	68	32



Obr. 12: Gradientová elúcia pre lipidomickú štúdiu

3.2.6 Získanie dát

V programe Sciex-OS bola vykonaná poloautomatická integrácia plôch píkov metabolitov a lipidov pre metabolomickú a lipidomickú štúdiu zvlášť. Následne boli integrácie manuálne kontrolované a doplnené. Na Obr. 13 je uvedený príklad integrovaného píku metabolitu (kreatínu/5aminolevulinátu) u vybranej kontrolnej vzorky vľavo a pacienta s AD vpravo.

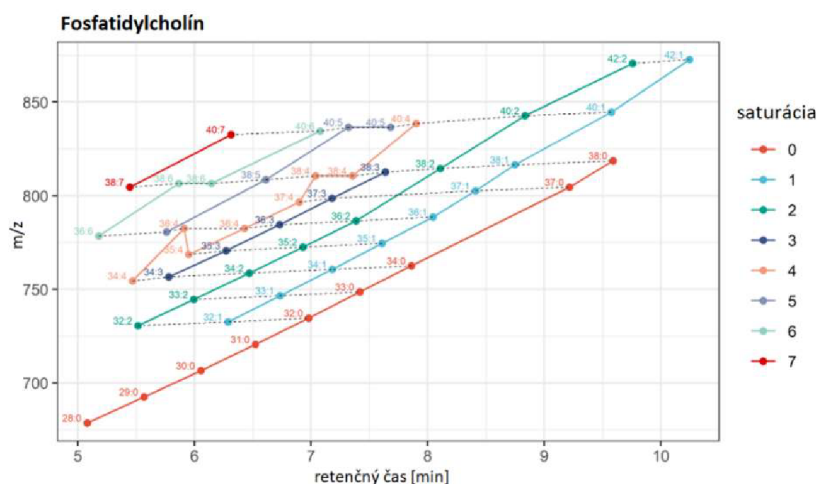


Obr. 13: Integrácia plochy pod píkom kreatínu/5aminolevulinátu u vybranej kontrolnej vzorky (vľavo) a pacienta s AD (vpravo).

3.2.7 Spracovanie dát a štatistická analýza

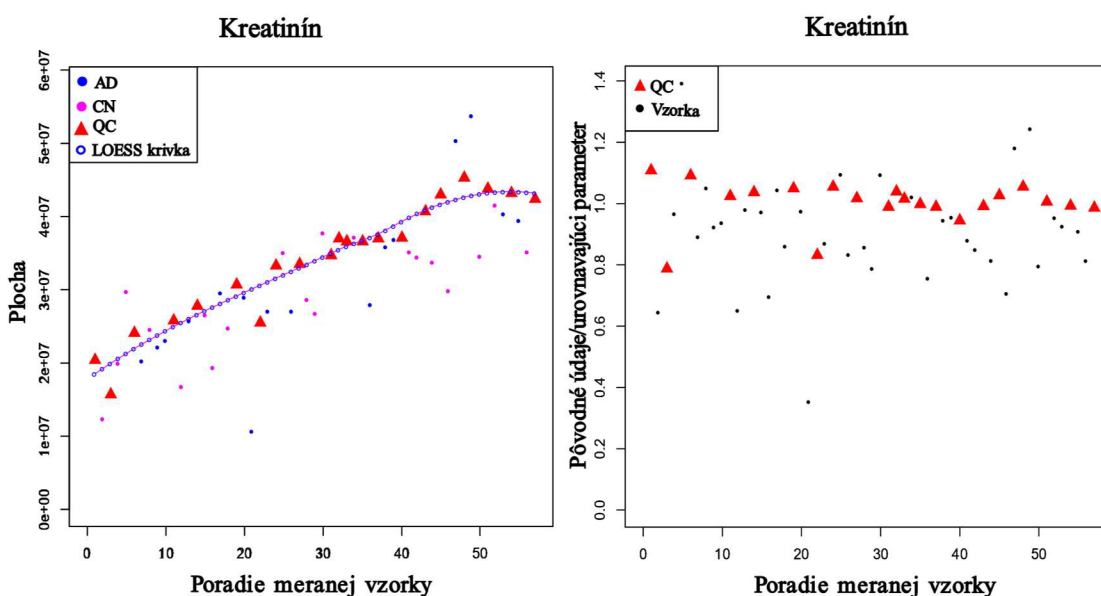
Metabolomické a lipidomické dáta boli spracované zvlášť pomocou nasledujúcich prístupov.

Pre lipidomické dáta boli najskôr pomocou programu RStudio skonštruované grafy retenčného chovania lipidov pre overenie ich správnej integrácie. Na Obr. 14 je znázornený graf retenčného chovania lipidov z lipidovej triedy fosfatidylcholínov.



Obr. 14: Graf retenčného chovania lipidov z lipidovej triedy fosfatidylcholínov, ktorý znázorňuje závislosť m/z na retenčnom čase. Saturácia odpovedá počtu dvojitych väzieb na acylových reťazcoch lipidovej triedy fosfatidylcholínov.

Následne získané metabolomické aj lipidomické dáta boli spracované prostredníctvom programu RStudio s využitím balíka Metabol (<https://github.com/AlzbetaG/Metabol>). V prvom kroku boli dáta podrobené interpolácií pomocou metódy LOESS (lokálne vážená regresia), čo slúži k odstráneniu systémovej chyby. Na Obr. 15 vľavo je znázornená LOESS krivka (pre metabolit kreatinín) určená z QC alikvotov a vpravo je znázornený výsledok po aplikácii LOESS, kedy došlo k urovnaniu vzoriek. Po interpolácií došlo k spočítaniu variačného koeficientu (CV), ktorý sa počíta z QC alikvotov pre každý metabolit a lipid zvlášť, pričom tie, ktoré mali CV väčšie ako 30 % boli zo súboru dát odstránené. Následne boli metabolity a lipidy vzťahnuté na jednotlivé interné štandardy, zvolené podľa podobnosti chemickej štruktúry (viď kapitola 4 Výsledky). Potom boli dáta spracované pomocou transformácie prirodzeným logaritmom a centrovane na nulovú hodnotu.



Obr. 15: Príklad interpolácie metabolitu kreatinínu (vľavo pred ňou a vpravo po nej).

Štatistická analýza pre metabolomickú a lipidomickú štúdiu bola vykonaná pomocou viacrozmerných a jednorozmerných prístupov. K tomu boli použité softvéry: RStudio, SIMCA a GraphPad Prism.

Viacrozmerná štatistická analýza sa rozdeľuje na nesupervizované a supervizované metódy. Nesupervizovaný prístup nerozpoznáva, ktoré vzorky patria do akej skupiny, na rozdiel od supervizovaného prístupu, ktorý s touto informáciou pracuje a rozdeľuje vzorky do preddefinovaných skupín. Z nesupervizovaných metód bola aplikovaná

analýza hlavných komponent (PCA – Principal Component Analysis) a zo supervizovaných metód bola použitá diskriminačná analýza najmenších štvorcov (PLS-DA - Partial Least Squares-Discriminant Analysis). Oba prístupy boli aplikované zvlášť na metabolomické a lipidomické dáta.

Následne bol uskutočnený Hotelling's T² test pre odhalenie odľahlých bodov z dátových súborov metabolomiky a lipidomiky.

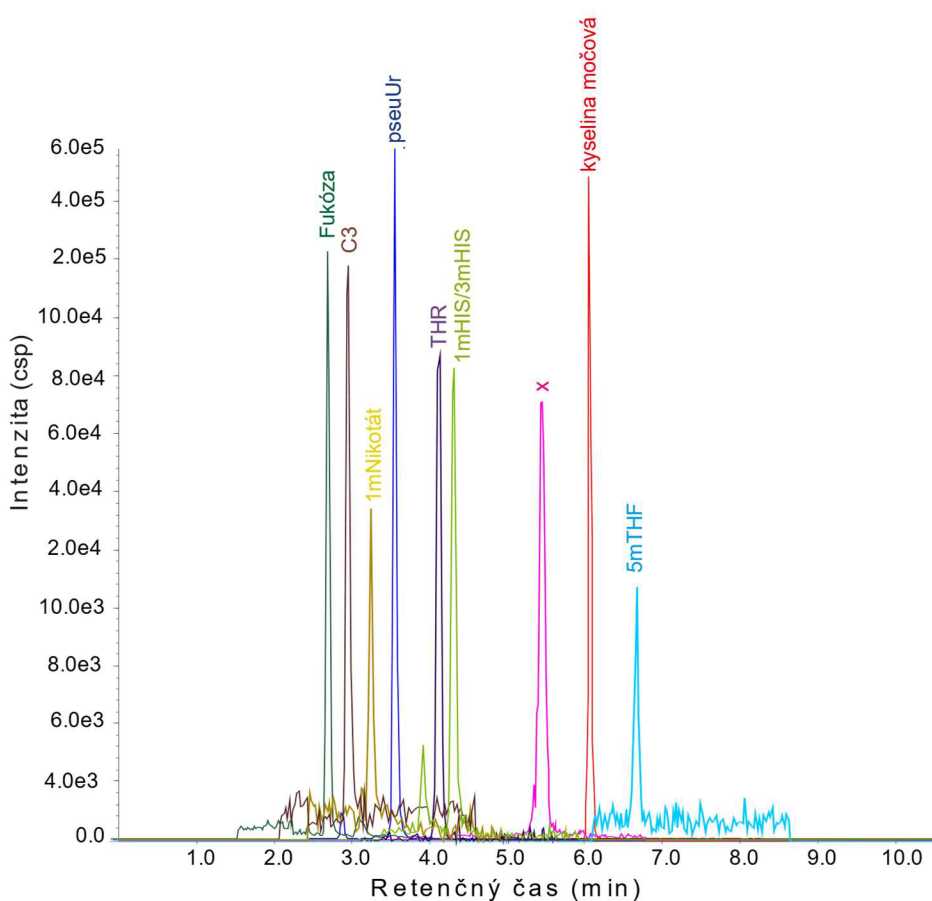
Pre overenie normality dát bol pre každú skupinu vzoriek určený Shapiro-Wilk test. Pre vizualizáciu jednorozmernej štatistickej analýzy (p-hodnôt a rozdielu mediánov) boli využité: Volcano grafy, metabolické/lipidomické mapy a krabicové grafy.

4 VÝSLEDKY

4.1 Detegované metabolity a lipidy

Pomocou cielenej metabolomickej analýzy bolo vo vzorkách detegovaných celkovo 96 metabolitov. Iba jeden metabolit (pantotenát) mal CV vyššie ako 30 %, takže výsledný počet bol 95 metabolitov (Tab. 15). Detegované metabolity boli rozdelené do skupín: acylkarnitíny (AC), amíny (AM), koenzými (Co), puríny (Pur), pyrimidíny (Pyr), aminokyseliny (AK) a ich deriváty (dAK), organické kyseliny (OK) a sacharidy (Sach). Z toho bolo 60 metabolitov ionizovaných v pozitívnom móde a 35 v negatívnom móde.

Na Obr. 16 je znázornený chromatogram zobrazujúci separácie metabolitov (podľa polarity), ktoré reprezentujú skupiny, do ktorých boli rozdelené.



Obr. 16: Chromatogram predstavujúci separáciu metabolitov prezentujúcich jednotlivé skupiny cielenej metabolomickej analýzy, ktoré boli detegované v QC alikvotách v pozitívnom aj negatívnom móde.

Tab. 15: Zoznam 95 metabolitov detegovaných cieľenou metabolomickou analýzou. V prípade izomérov, ktoré použitá metóda nebola schopná rozlíšiť, sú názvy a skratky metabolitov uvedené s lomítkom.

Názov metabolitu	Skratka	Skupina	Interný štandard	ESI mód	Retenčný čas [min]	Q1 [m/z]	Q3 [m/z]
butyryl-L-karnitín/izobutyryl-L-karnitín	C4	AC	C4_d3	pozitívny	2,90	232,20	85,10
valeryl-L-karnitín/izovaleryl-L-karnitín/2-metylbutyryl-L-karnitín	C5	AC	C4_d3	pozitívny	2,80	246,20	85,10
2-metylbut-2-enoyl-L-karnitín/3-metylkrotonyl-L-karnitín	C5.1	AC	C4_d3	pozitívny	2,86	244,20	85,10
acetyl-L-karnitín	C2	AC	C4_d3	pozitívny	3,23	204,10	85,10
2-trans-oktenoyl-L-karnitín	C8.1	AC	C4_d3	pozitívny	2,67	286,20	85,10
4-cis-decenoyl-L-karnitín	C10.1	AC	C4_d3	pozitívny	2,58	314,20	85,10
oktanoyl-L-karnitín	C8	AC	C4_d3	pozitívny	2,63	288,20	85,10
nonanoyl-L-karnitín	C9	AC	C4_d3	pozitívny	2,57	302,20	85,10
3-hydroxypropionyl-L-carnitine	C3.OH	AC	C4_d3	pozitívny	2,90	234,10	85,10
glutaryl-L-karnitín/ 3-hydroxyhexanoyl-L-karnitín	C5.DC/C6.OH	AC	C4_d3	pozitívny	3,38	276,20	85,10
sukcinyl-L-karnitín/3-hydroxyisovaleryl-L-karnitín	C4.DC/C5.OH	AC	C4_d3	pozitívny	3,17	262,20	85,10
hexanoyl-L-karnitín	C6	AC	C4_d3	pozitívny	2,73	260,20	85,10
pimelyl-L-karnitín/ 3-hydroxyoktanoyl-L-karnitín	C7.DC/C8.OH	AC	C4_d3	pozitívny	2,86	85,10	3,20
L-karnitín	C0	AC	C4_d3	pozitívny	3,78	161,90	102,90
dekanoyl-L-karnitín	C10	AC	C4_d3	pozitívny	2,58	316,20	85,10
propionyl-L-karnitín	C3	AC	C4_d3	pozitívny	3,04	218,10	85,10
kreatinín	kreatinín	AM	kreatín_d3	pozitívny	2,65	113,90	86,00
močovina	močovina	AM	kreatín_d3	pozitívny	2,24	61,00	44,00
spermin	spermin	AM	kreatín_d3	pozitívny	3,13	203,90	138,00
kyselina močová	kyselina močová	AM	kreatín_d3	negatívny	6,08	167,00	124,00
kreatín/5-aminolevulinát	kreatín/5nh2Levul	AM	kreatín_d3	pozitívny	3,70	131,90	89,90
alantoín	alantoín	AM	kreatín_d3	negatívny	3,47	156,90	114,10

Tab. 15 (pokračovanie): Zoznam 95 metabolitov detegovaných cieľenou metabolickou analýzou. V prípade izomérov, ktoré použitá metóda nebola schopná rozlíšiť, sú názvy a skratky metabolitov uvedené s lomítkom.

Názov metabolitu	Skratka	Skupina	Interný štandard	ESI mód	Retenčný čas [min]	Q1 [m/z]	Q3 [m/z]
O-fosfoctanolamín	EtOHNH ₂ P	AM	kreatín_d3	negatívny	6,08	139,80	78,90
nikotínamid	nikotínamid	Co	kreatín_d3	pozitívny	1,52	122,90	79,90
riboflavín	riboflavín	Co	kreatín_d3	pozitívny	2,79	376,90	243,00
5-metyltetrahydrofolát	5mTHF	Co	kreatín_d3	pozitívny	6,73	460,00	313,00
adenozín	Adenozín	Pur	kreatín_d3	pozitívny	2,89	268,15	136,10
inozín	Hr	Pur	kreatín_d3	pozitívny	4,12	268,90	136,90
aminoimidazol karboxamid ribozid (akadesín)	AICAr	Pur	kreatín_d3	pozitívny	3,15	259,10	110,00
N-formylglycinamid ribozid	FGAr	Pur	kreatín_d3	negatívny	3,01	233,00	143,10
5-metyltioadenozín	5mthioAr	Pur	kreatín_d3	pozitívny	2,42	297,90	135,90
hypoxantín	HX	Pur	kreatín_d3	pozitívny	4,01	136,90	109,90
xantín	X	Pur	kreatín_d3	negatívny	5,45	150,90	108,00
1-metylxantín	1mX	Pur	kreatín_d3	negatívny	4,28	164,90	108,00
7-metylguanín	7mG	Pur	kreatín_d3	negatívny	3,06	164,00	106,10
cytidín	Cr	Pyr	kreatín_d3	pozitívny	3,25	244,00	111,90
pseudouridín	pseuUr	Pyr	kreatín_d3	negatívny	3,59	242,80	153,00
uridín	Ur	Pyr	kreatín_d3	negatívny	2,93	242,80	110,00
cytozín	C	Pyr	kreatín_d3	pozitívny	2,77	111,90	94,80
uracil	U	Pyr	kreatín_d3	negatívny	2,64	110,95	42,10
L-glutamín	GLN	AK	LEU_d3	pozitívny	4,19	146,90	83,90
L-lyzín	LYS	AK	LEU_d3	pozitívny	4,84	146,90	83,90
L-prolín	PRO	AK	LEU_d3	pozitívny	3,82	115,90	69,90
L-tyrozín	TYR	AK	LEU_d3	pozitívny	4,15	181,90	136,00
L-arginín	ARG	AK	LEU_d3	negatívny	4,46	173,04	131,10
L-serín	SER	AK	LEU_d3	pozitívny	4,35	105,80	60,00
L-aspartát	ASP	AK	LEU_d3	negatívny	5,63	131,95	88,10
L-fenylalanín	PHE	AK	LEU_d3	pozitívny	3,69	165,90	119,90
L-tryptofán	TRP	AK	LEU_d3	pozitívny	3,84	204,90	145,80
L-izoleucín/L-alozoleucín	ILE/aILE	AK	LEU_d3	pozitívny	3,53	132,00	69,00
L-valín	VAL	AK	LEU_d3	pozitívny	3,69	117,90	72,10
L-metionín	MET	AK	LEU_d3	pozitívny	3,76	149,90	104,00
L-treonín/ L-homoserín	THR/hSER	AK	LEU_d3	pozitívny	4,16	119,90	73,90
L-histidín	HIS	AK	LEU_d3	pozitívny	4,38	155,90	110,00
L-leucín	LEU	AK	LEU_d3	pozitívny	3,71	132,00	43,00
L-asparagín	ASN	AK	LEU_d3	pozitívny	4,32	132,94	74,10
glycín	GLY	AK	LEU_d3	pozitívny	4,19	75,90	29,90
L-alanín/ β-alanín	ALA/bALA	AK	LEU_d3	pozitívny	3,71	89,90	44,10
izobutyrylglycín/ butyrylglycín	ibutGLY/butGLY	AK	LEU_d3	pozitívny	4,19	143,90	74,00
5-oxoprolín/ L-homoprolín	5oxoPRO/hPRO	AK	LEU_d3	pozitívny	4,19	129,90	83,90
L-ornitín	ORN	AK	LEU_d3	pozitívny	4,83	132,90	115,60
taurín	TAU	AK	LEU_d3	negatívny	4,06	123,80	79,90

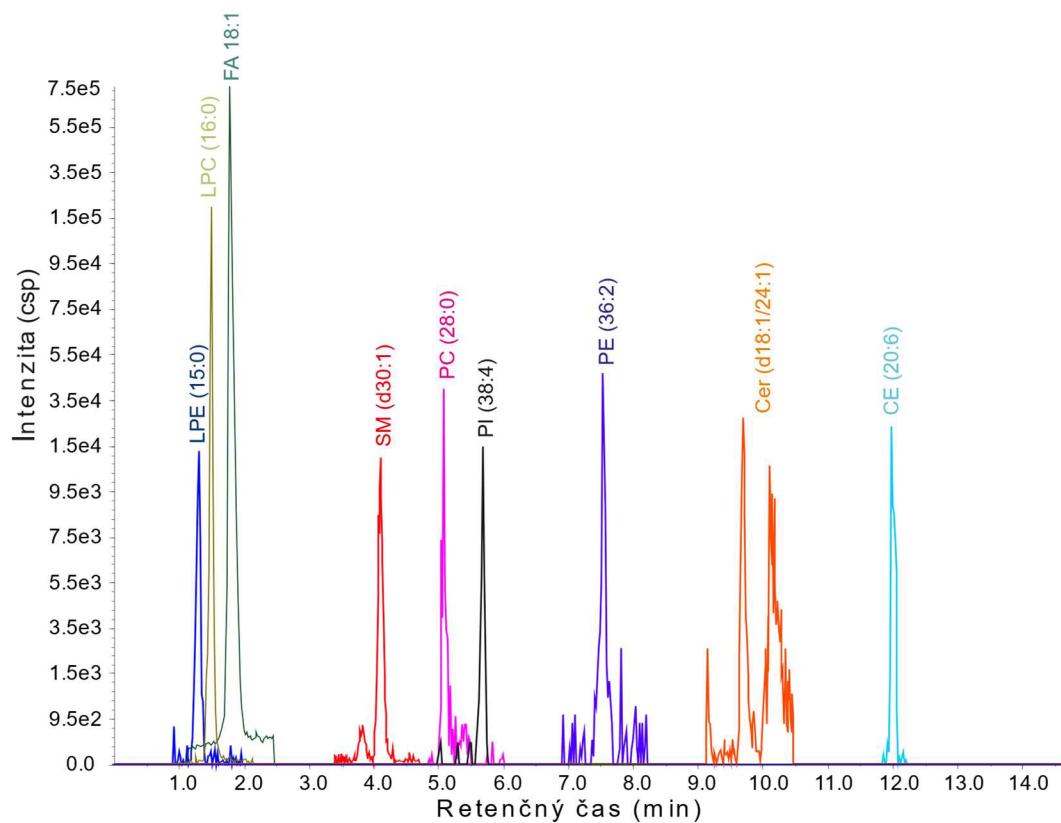
Tab. 15 (pokračovanie): Zoznam 95 metabolitov detegovaných cieľenou metabolomickou analýzou. V prípade izomérov, ktoré použitá metóda nebola schopná rozlíšiť, sú názvy a skratky metabolitov uvedené s lomítkom.

Názov metabolitu	Skratka	Skupina	Interný štandard	ESI mód	Retenčný čas [min]	Q1 [m/z]	Q3 [m/z]
cholín	cholín	dAK	LEU_d3	pozitívny	4,25	104,30	60,00
L-citrulín	citrulín	dAK	LEU_d3	negatívny	4,17	174,02	131,20
L-kynurenín	kynurenín	dAK	LEU_d3	pozitívny	3,72	208,90	93,90
3-indolepropanoát	indoleProp	dAK	LEU_d3	negatívny	4,06	187,80	116,20
N,N-dimetylglycín/ 2,2-dimetylglycín	N.NdimGLY/ 2.2dimGLY	dAK	LEU_d3	pozitívny	3,83	103,90	58,00
3-metylhistidín/ 1-metylhistidín	3mHIS/1mHIS	dAK	LEU_d3	pozitívny	4,00	169,90	123,90
homoarginín	hARG	dAK	LEU_d3	pozitívny	4,40	188,90	84,00
N-acetyl-L-alanín	AcALA	dAK	LEU_d3	negatívny	4,26	130,00	88,10
S-adenozyl-L-metionín	ArMET	dAK	LEU_d3	pozitívny	4,08	399,01	250,10
1-metylhistidín/ 3-metylhistidín	1mHIS/3mHIS	dAK	LEU_d3	pozitívny	4,40	169,90	96,00
4-hydroxy-L-prolín	ohPRO	dAK	LEU_d3	pozitívny	3,97	132,00	68,00
N-acetylmationín	AcMET	dAK	LEU_d3	negatívny	3,87	189,90	141,90
L-cystín	CYStín	dAK	LEU_d3	pozitívny	6,05	240,90	151,80
laktát	laktát	OK	LEU_d3	negatívny	4,35	88,90	43,00
2-hydroxybutanoát/ 2-hydroxyizobutanoát	2ohBut/2ohIsobut	OK	LEU_d3	negatívny	4,03	102,90	57,00
pyruvát	pyruvát	OK	LEU_d3	negatívny	7,27	86,93	43,10
leucinát	leucinát	OK	LEU_d3	negatívny	3,70	130,80	84,70
suberát	suberát	OK	LEU_d3	negatívny	7,25	172,90	111,00
2-hydroxyizovalerát	2ohIsovaler	OK	LEU_d3	negatívny	3,81	116,90	71,10
2-hydroxyglutarát	2ohGlutar	OK	LEU_d3	negatívny	7,25	146,90	128,90
1-metylnikotinát	1mNikotát	OK	LEU_d3	pozitívny	3,37	138,00	92,10
kyselina dokozahexaenová	DHA	OK	LEU_d3	negatívny	3,10	327,20	283,20
kyselina sialová	kyselina sialová	OK	LEU_d3	negatívny	5,09	309,00	87,00
fukóza	fukóza	Sach	LEU_d3	negatívny	2,88	162,80	59,10
galaktitol/ manitol	galaktitol/manitol	Sach	LEU_d3	negatívny	3,27	180,80	100,80
arabitol/ ribitol	arabitol/ribitol	Sach	LEU_d3	negatívny	3,06	150,90	71,00
myoinozitol	myoinozitol	Sach	LEU_d3	negatívny	3,70	178,90	124,90
N-acetyl-D-glukozamín/ N-acetyl-D-galaktozamín/ N-acetyl-D-manozamín	AcHexózy	Sach	LEU_d3	pozitívny	3,12	221,90	138,10
melibióza/sacharóza/ laktóza/maltóza	MEL/SUC/ LAC/MAL	Sach	LEU_d3	negatívny	3,65	340,90	179,00
hexózy	hexózy	Sach	LEU_d3	negatívny	3,38	178,90	88,90
D-glukonát	glukonát	Sach	LEU_d3	negatívny	5,27	194,80	129,00
treonát	treonát	Sach	LEU_d3	negatívny	5,06	135,00	75,10
D-glukuronát	glukuronát	Sach	LEU_d3	negatívny	5,60	192,80	113,00

ESI, elektrosprej; Q1, *m/z* molekulového iónu; Q3, *m/z* produktového iónu; AC, acylkarnitín; AM, amín; Co, koenzým; Pur, purín; Pyr, pyrimidín; AK, aminokyselina; dAK, derivát aminokyseliny; OK, organická kyselina; Sach, sacharid.

V lipidomickej štúdií bolo v meraných vzorkách detegovaných 205 lipidov, pričom 16 lipidov malo CV nad 30 %, takže finálny počet bol 189 lipidov (Tab. 16). Detegované lipidy boli z 15 tried: voľné mastné kyseliny (FA), fosfatidylozitol (PI), cholesterol, cholesterol estery (CE), ceramidy (Cer), hexozylceramidy (HexCer), lyzofosfatidylcholín (LPC), lyzofosfatidyletanolamín (LPE), fosfatidylcholín (PC), fosfatidylcholín s akyl/alkenyl éterovým substituentom (PC(O-/P-)), fosfatidyletanolamín (PE), fosfatidyletanolamín s alkyl/akenyl éterovým substituentom (PE(O-/P-)), sfingomyelín (SM). Z toho bolo 16 lipidov ionizovaných v negatívnom móde a 173 lipidov bolo ionizovaných v pozitívnom móde.

Na Obr. 17 je znázornený chromatogram pre jednotlivé lipidy, ktoré reprezentujú vybrané lipidové kategórie, do ktorých boli rozdelené.



Obr. 17: Chromatogram separácie lipidov prezentujúcich vybrané lipidové triedy cieľenej lipidomickej analýzy detegované v QC alikvóte v pozitívnom aj negatívnom móde. CE, cholesterol ester; Cer, ceramid; LPC, lyzofosfatidylcholín; LPE, lyzofosfatidyletanolamín; PC, fosfatidylcholín; PE, fosfatidyletanolamín; PI, fosfatidylozitol; SM, sfingomyelín.

Tab. 16: Zoznam 189 lipidov detegovaných cieľenou lipidomickou analýzou. Izomery sú označené rovnakým názvom, ale za pomlčkou iným číslom.

Názov lipidu	Interný štandard	Trieda	ESI mód	Retenčný čas [min]	Q1 [m/z]	Q3 [m/z]
FA 14:0	FA_18:1_d9	FA	negatívny	1,33	227,20	227,20
FA 15:0	FA_18:1_d9	FA	negatívny	1,48	241,20	241,20
FA 16:0	FA_18:1_d9	FA	negatívny	1,67	255,20	255,20
FA 16:1	FA_18:1_d9	FA	negatívny	1,43	253,20	253,20
FA 18:0	FA_18:1_d9	FA	negatívny	2,20	283,30	283,30
FA 18:1	FA_18:1_d9	FA	negatívny	1,80	281,20	281,20
FA 18:2	FA_18:1_d9	FA	negatívny	1,50	279,20	279,20
PC(17:0_18:2)	15:0-18:1(d7) PC	PC	negatívny	6,46	816,59	279,23
PC(17:0_20:4)	15:0-18:1(d7) PC	PC	negatívny	6,42	840,59	303,23
PE(18:0_20:4)	15:0-18:1(d7) PE	PE	negatívny	7,48	766,54	303,23
PE(18:0_22:4)	15:0-18:1(d7) PE	PE	negatívny	8,02	794,57	331,26
PI(16:0_20:4)	15:0-18:1(d7) PI	PI	negatívny	4,75	857,52	303,23
PI(18:0_20:4)	15:0-18:1(d7) PI	PI	negatívny	5,69	885,55	283,30
PI(36:4)	15:0-18:1(d7) PI	PI	negatívny	4,75	857,50	241,00
PI(38:4)	15:0-18:1(d7) PI	PI	negatívny	5,69	885,50	241,00
Cholesterol	Cholesterol(d7)	Cholesterol	negatívny	4,65	369,40	369,40
CE(16:0)	18:1 (d7) CE	CE	pozitívny	12,57	642,60	369,40
CE(16:1)	18:1 (d7) CE	CE	pozitívny	12,12	640,60	369,40
CE(18:1)	18:1 (d7) CE	CE	pozitívny	12,60	668,60	369,40
CE(18:2)	18:1 (d7) CE	CE	pozitívny	12,18	666,60	369,40
CE(20:4)	18:1 (d7) CE	CE	pozitívny	11,87	690,60	369,40
CE(20:5)	18:1 (d7) CE	CE	pozitívny	11,45	688,60	369,40
CE(22:6)	18:1 (d7) CE	CE	pozitívny	11,59	714,60	369,40
Cer(d16:1/24:1)	C15 Ceramid-d7 (d18:1-d7/15:0)	Cer	pozitívny	8,94	620,60	236,20
Cer(d18:1/22:2)	C15 Ceramid-d7 (d18:1-d7/15:0)	Cer	pozitívny	9,43	618,60	264,30
Cer(d18:1/24:1)	C15 Ceramid-d7 (d18:1-d7/15:0)	Cer	pozitívny	9,57	648,60	264,30
Cer(d18:2/24:1)	C15 Ceramid-d7 (d18:1-d7/15:0)	Cer	pozitívny	9,01	646,60	262,20
HexCer(d18:1/22:1)	C15 Ceramid-d7 (d18:1-d7/15:0)	HexCer	pozitívny	8,80	782,70	264,30
HexCer(d18:1/24:1)	C15 Ceramid-d7 (d18:1-d7/15:0)	HexCer	pozitívny	9,02	810,70	264,30
LPC(15:0)	18:1 (d7) LPC	LPC	pozitívny	1,31	482,30	184,10
LPC(16:0)	18:1 (d7) LPC	LPC	pozitívny	1,45	496,30	184,10
LPC(16:1)	18:1 (d7) LPC	LPC	pozitívny	1,26	494,30	184,10
LPC(18:0)	18:1 (d7) LPC	LPC	pozitívny	1,85	524,40	184,10
LPC(18:1)	18:1 (d7) LPC	LPC	pozitívny	1,54	522,40	184,10
LPC(18:2)	18:1 (d7) LPC	LPC	pozitívny	1,31	520,30	184,10
LPC(20:1)	18:1 (d7) LPC	LPC	pozitívny	1,93	550,40	184,10
LPC(20:3)	18:1 (d7) LPC	LPC	pozitívny	1,41	546,40	184,10
LPC(20:4)	18:1 (d7) LPC	LPC	pozitívny	1,30	544,30	184,10
LPC(22:6)	18:1 (d7) LPC	LPC	pozitívny	1,24	568,30	184,10
LPC(24:0)	18:1 (d7) LPC	LPC	pozitívny	4,37	608,50	184,10
LPC(25:0)	18:1 (d7) LPC	LPC	pozitívny	4,91	622,50	184,10
LPC(26:0)	18:1 (d7) LPC	LPC	pozitívny	5,49	636,50	184,10
LPC(26:1)	18:1 (d7) LPC	LPC	pozitívny	4,38	634,50	184,10
LPE(15:0)	18:1 (d7) LPE	LPE	pozitívny	1,33	440,30	299,30
LPE(18:0)	18:1 (d7) LPE	LPE	pozitívny	1,88	482,30	341,30

Tab. 16 (pokračovanie): Zoznam 189 lipidov detegovaných cieľenou lipidomickou analýzou. Izomery sú označené rovnakým názvom, ale za pomlčkou iným číslom.

Názov lipidu	Interný štandard	Trieda	ESI mód	Retenčný čas [min]	Q1 [m/z]	Q3 [m/z]
LPE(18:2)	18:1 (d7) LPE	LPE	pozitívny	1,33	478,30	337,30
PC(28:0)	15:0-18:1(d7) PC	PC	pozitívny	5,08	678,50	184,10
PC(29:0)	15:0-18:1(d7) PC	PC	pozitívny	5,57	692,50	184,10
PC(30:0)	15:0-18:1(d7) PC	PC	pozitívny	6,05	706,50	184,10
PC(31:0)	15:0-18:1(d7) PC	PC	pozitívny	6,52	720,60	184,10
PC(32:0)	15:0-18:1(d7) PC	PC	pozitívny	6,98	734,60	184,10
PC(32:1)	15:0-18:1(d7) PC	PC	pozitívny	6,29	732,60	184,10
PC(32:2)	15:0-18:1(d7) PC	PC	pozitívny	5,51	730,50	184,10
PC(33:0)	15:0-18:1(d7) PC	PC	pozitívny	7,42	748,60	184,10
PC(33:1)	15:0-18:1(d7) PC	PC	pozitívny	6,73	746,60	184,10
PC(33:2)	15:0-18:1(d7) PC	PC	pozitívny	5,99	744,60	184,10
PC(34:0)	15:0-18:1(d7) PC	PC	pozitívny	7,86	762,60	184,10
PC(34:1)	15:0-18:1(d7) PC	PC	pozitívny	7,18	760,60	184,10
PC(34:2)	15:0-18:1(d7) PC	PC	pozitívny	6,47	758,60	184,10
PC(34:3)	15:0-18:1(d7) PC	PC	pozitívny	5,78	756,60	184,10
PC(34:4)	15:0-18:1(d7) PC	PC	pozitívny	5,47	754,50	184,10
PC(35:1)	15:0-18:1(d7) PC	PC	pozitívny	7,61	774,60	184,10
PC(35:2)	15:0-18:1(d7) PC	PC	pozitívny	6,93	772,60	184,10
PC(35:4)	15:0-18:1(d7) PC	PC	pozitívny	5,95	768,60	184,10
PC(36:1)	15:0-18:1(d7) PC	PC	pozitívny	8,05	788,60	184,10
PC(36:2)	15:0-18:1(d7) PC	PC	pozitívny	7,39	786,60	184,10
PC(36:3)	15:0-18:1(d7) PC	PC	pozitívny	6,73	784,60	184,10
PC(36:4-1)	15:0-18:1(d7) PC	PC	pozitívny	6,43	782,60	184,10
PC(36:4-2)	15:0-18:1(d7) PC	PC	pozitívny	5,91	782,60	184,10
PC(36:5)	15:0-18:1(d7) PC	PC	pozitívny	5,76	780,60	184,10
PC(37:0)	15:0-18:1(d7) PC	PC	pozitívny	9,22	804,60	184,10
PC(37:3)	15:0-18:1(d7) PC	PC	pozitívny	7,18	798,60	184,10
PC(37:4)	15:0-18:1(d7) PC	PC	pozitívny	6,90	796,60	184,10
PC(38:0)	15:0-18:1(d7) PC	PC	pozitívny	9,59	818,70	184,10
PC(38:1)	15:0-18:1(d7) PC	PC	pozitívny	8,75	816,60	184,10
PC(38:2)	15:0-18:1(d7) PC	PC	pozitívny	8,11	814,60	184,10
PC(38:3)	15:0-18:1(d7) PC	PC	pozitívny	7,64	812,60	184,10
PC(38:4-1)	15:0-18:1(d7) PC	PC	pozitívny	7,35	810,60	184,10
PC(38:4-2)	15:0-18:1(d7) PC	PC	pozitívny	7,04	810,60	184,10
PC(38:5)	15:0-18:1(d7) PC	PC	pozitívny	6,61	808,60	184,10
PC(38:6-1)	15:0-18:1(d7) PC	PC	pozitívny	6,14	806,60	184,10
PC(38:6-2)	15:0-18:1(d7) PC	PC	pozitívny	5,86	806,60	184,10
PC(40:1)	15:0-18:1(d7) PC	PC	pozitívny	9,57	844,70	184,10
PC(40:4)	15:0-18:1(d7) PC	PC	pozitívny	7,90	838,60	184,10
PC(40:5-1)	15:0-18:1(d7) PC	PC	pozitívny	7,68	836,60	184,10
PC(40:5-2)	15:0-18:1(d7) PC	PC	pozitívny	7,32	836,60	184,10
PC(40:6)	15:0-18:1(d7) PC	PC	pozitívny	7,08	834,60	184,10
PC(40:7)	15:0-18:1(d7) PC	PC	pozitívny	6,31	832,60	184,10
PC(42:1)	15:0-18:1(d7) PC	PC	pozitívny	10,24	858,70	184,10
PC(42:2)	15:0-18:1(d7) PC	PC	pozitívny	9,76	870,70	184,10
PC(O-30:0)	15:0-18:1(d7) PC	PC (O-)	pozitívny	6,66	692,60	184,10
PC(P-30:0)	15:0-18:1(d7) PC	PC (P-)	pozitívny	6,60	690,50	184,10
PC(O-32:0)	15:0-18:1(d7) PC	PC (O-)	pozitívny	7,54	720,60	184,10
PC(O-32:1)	15:0-18:1(d7) PC	PC (O-)	pozitívny	6,96	718,60	184,10
PC(P-32:0)	15:0-18:1(d7) PC	PC (P-)	pozitívny	7,49	718,60	184,10

Tab. 16 (pokračovanie): Zoznam 189 lipidov detegovaných cieľenou lipidomickou analýzou. Izomery sú označené rovnakým názvom, ale za pomlčkou iným číslom.

Názov lipidu	Interný štandard	Trieda	ESI mód	Retenčný čas [min]	Q1 [m/z]	Q3 [m/z]
PC(P-32:1)	15:0-18:1(d7) PC	PC (P-)	pozitívny	6,88	716,60	184,10
PC(O-33:4)	15:0-18:1(d7) PC	PC (O-)	pozitívny	5,78	726,50	184,10
PC(O-34:0)	15:0-18:1(d7) PC	PC (O-)	pozitívny	8,41	748,60	184,10
PC(O-34:1)	15:0-18:1(d7) PC	PC (O-)	pozitívny	7,70	746,60	184,10
PC(O-34:2)	15:0-18:1(d7) PC	PC (O-)	pozitívny	7,04	744,60	184,10
PC(P-34:1)	15:0-18:1(d7) PC	PC (P-)	pozitívny	7,67	744,60	184,10
PC(P-34:2)	15:0-18:1(d7) PC	PC (P-)	pozitívny	6,96	742,60	184,10
PC(O-36:0)	15:0-18:1(d7) PC	PC (O-)	pozitívny	9,18	776,70	184,10
PC(O-36:1)	15:0-18:1(d7) PC	PC (O-)	pozitívny	8,52	774,60	184,10
PC(O-36:2)	15:0-18:1(d7) PC	PC (O-)	pozitívny	7,86	772,60	184,10
PC(P-36:1)	15:0-18:1(d7) PC	PC (P-)	pozitívny	8,50	772,60	184,10
PC(P-36:2)	15:0-18:1(d7) PC	PC (P-)	pozitívny	7,79	770,60	184,10
PC(O-36:4)	15:0-18:1(d7) PC	PC (O-)	pozitívny	7,00	768,60	184,10
PC(P-36:4)	15:0-18:1(d7) PC	PC (P-)	pozitívny	6,89	766,60	184,10
PC(O-38:1)	15:0-18:1(d7) PC	PC (O-)	pozitívny	9,21	802,70	184,10
PC(O-38:2)	15:0-18:1(d7) PC	PC (O-)	pozitívny	8,60	800,70	184,10
PC(O-38:4)	15:0-18:1(d7) PC	PC (O-)	pozitívny	7,89	796,60	184,10
PC(O-38:5)	15:0-18:1(d7) PC	PC (O-)	pozitívny	7,12	794,60	184,10
PC(P-38:4)	15:0-18:1(d7) PC	PC (P-)	pozitívny	7,79	794,60	184,10
PC(O-38:6)	15:0-18:1(d7) PC	PC (O-)	pozitívny	6,69	792,60	184,10
PC(P-38:5)	15:0-18:1(d7) PC	PC (P-)	pozitívny	7,02	792,60	184,10
PC(P-38:6)	15:0-18:1(d7) PC	PC (P-)	pozitívny	6,59	790,60	184,10
PC(O-40:1)	15:0-18:1(d7) PC	PC (O-)	pozitívny	9,87	830,70	184,10
PC(O-40:4)	15:0-18:1(d7) PC	PC (O-)	pozitívny	8,72	824,70	184,10
PC(O-40:6)	15:0-18:1(d7) PC	PC (O-)	pozitívny	7,61	820,60	184,10
PC(P-40:6)	15:0-18:1(d7) PC	PC (P-)	pozitívny	7,50	818,60	184,10
PC(O-42:2)	15:0-18:1(d7) PC	PC (O-)	pozitívny	9,99	856,70	184,10
PC(O-42:4)	15:0-18:1(d7) PC	PC (O-)	pozitívny	9,48	852,70	184,10
PC(O-42:5)	15:0-18:1(d7) PC	PC (O-)	pozitívny	8,71	850,70	184,10
PE(34:1)	15:0-18:1 (d7) PE	PE	pozitívny	7,32	718,50	577,50
PE(36:1)	15:0-18:1 (d7) PE	PE	pozitívny	8,18	746,60	605,60
PE(36:2)	15:0-18:1 (d7) PE	PE	pozitívny	7,50	744,60	603,50
PE(36:4)	15:0-18:1 (d7) PE	PE	pozitívny	6,57	740,50	599,50
PE(38:3)	15:0-18:1 (d7) PE	PE	pozitívny	7,76	770,60	629,60
PE(38:4-1)	15:0-18:1 (d7) PE	PE	pozitívny	7,49	768,60	627,50
PE(38:4-2)	15:0-18:1 (d7) PE	PE	pozitívny	7,17	768,60	627,50
PE(38:5)	15:0-18:1 (d7) PE	PE	pozitívny	6,74	766,50	625,50
PE(38:6)	15:0-18:1 (d7) PE	PE	pozitívny	6,28	764,50	623,50
PE(40:4)	15:0-18:1 (d7) PE	PE	pozitívny	8,03	796,60	655,60
PE(40:5)	15:0-18:1 (d7) PE	PE	pozitívny	7,81	794,60	653,60
PE(40:6)	15:0-18:1 (d7) PE	PE	pozitívny	7,21	792,60	651,50
PE(40:7)	15:0-18:1 (d7) PE	PE	pozitívny	6,45	790,50	649,50
PE(P-16:0/18:1)	15:0-18:1 (d7) PE	PE (P-)	pozitívny	7,84	702,50	364,00
PE(P-18:0/18:1)	15:0-18:1 (d7) PE	PE (P-)	pozitívny	8,66	730,60	392,00
PE(P-18:1/18:1)	15:0-18:1 (d7) PE	PE (P-)	pozitívny	7,94	728,60	390,00
PE(P-16:0/20:4)	15:0-18:1 (d7) PE	PE (P-)	pozitívny	7,06	724,50	364,00
PE(O-38:4)	15:0-18:1 (d7) PE	PE (O-)	pozitívny	7,74	754,60	613,60
PE(P-16:0/22:4)	15:0-18:1 (d7) PE	PE (P-)	pozitívny	7,66	752,60	364,00
PE(P-18:0/20:4)	15:0-18:1 (d7) PE	PE (P-)	pozitívny	7,95	752,60	392,00

Tab. 16 (pokračovanie): Zoznam 189 lipidov detegovaných cieľenou lipidomickou analýzou. Izomery sú označené rovnakým názvom, ale za pomlčkou iným číslom.

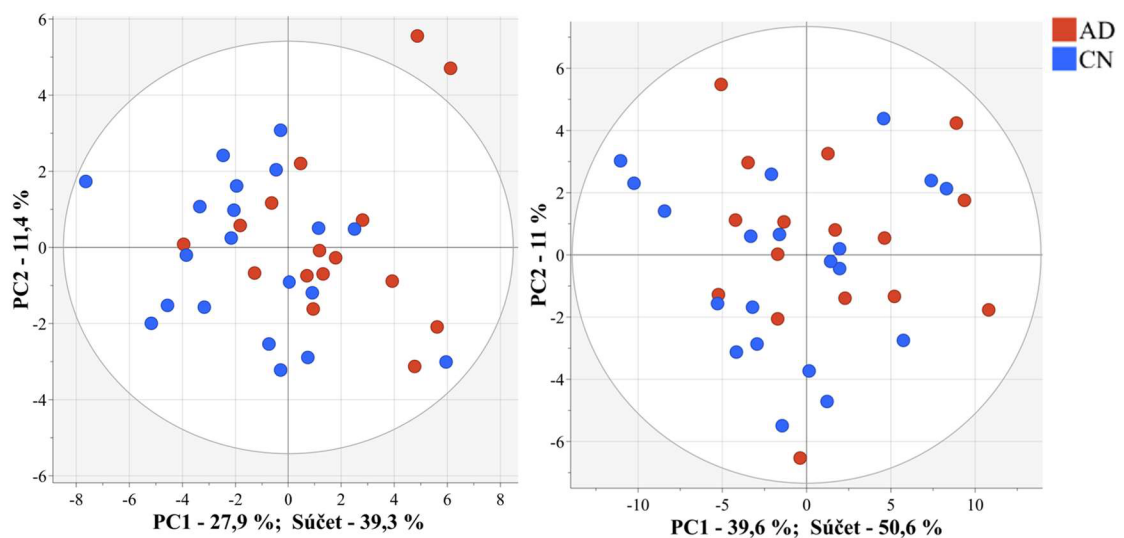
Názov lipidu	Interný štandard	Trieda	ESI mód	Retenčný čas [min]	Q1 [m/z]	Q3 [m/z]
PE(O-38:6)	15:0-18:1 (d7) PE	PE (O-)	pozitívny	6,86	750,50	609,50
PE(P-18:1/20:4)	15:0-18:1 (d7) PE	PE (P-)	pozitívny	7,19	750,50	390,00
PE(P-16:0/22:6)	15:0-18:1 (d7) PE	PE (P-)	pozitívny	6,76	748,50	364,00
PE(O-40:4)	15:0-18:1 (d7) PE	PE (O-)	pozitívny	8,56	782,60	641,60
PE(P-18:0/22:4)	15:0-18:1 (d7) PE	PE (P-)	pozitívny	8,48	780,60	392,00
PE(O-40:6)	15:0-18:1 (d7) PE	PE (O-)	pozitívny	7,76	778,60	637,60
PE(P-18:0/22:6)	15:0-18:1 (d7) PE	PE (P-)	pozitívny	7,67	776,60	392,00
PE(P-18:1/22:6)	15:0-18:1 (d7) PE	PE (P-)	pozitívny	6,88	774,50	390,00
SM(d30:1)	18:1 (d9) SM	SM	pozitívny	4,05	647,50	184,10
SM(d30:2)	18:1 (d9) SM	SM	pozitívny	3,28	645,50	184,10
SM(d31:1)	18:1 (d9) SM	SM	pozitívny	4,51	661,50	184,10
SM(d32:0)	18:1 (d9) SM	SM	pozitívny	5,36	677,60	184,10
SM(d32:1)	18:1 (d9) SM	SM	pozitívny	5,02	675,50	184,10
SM(d32:2)	18:1 (d9) SM	SM	pozitívny	4,19	673,50	184,10
SM(d33:1)	18:1 (d9) SM	SM	pozitívny	5,52	689,60	184,10
SM(d33:2)	18:1 (d9) SM	SM	pozitívny	4,68	687,50	184,10
SM(d34:0)	18:1 (d9) SM	SM	pozitívny	6,34	705,60	184,10
SM(d34:1)	18:1 (d9) SM	SM	pozitívny	6,01	703,60	184,10
SM(d18:1/16:0)	18:1 (d9) SM	SM	pozitívny	6,01	703,58	264,27
SM(d34:2)	18:1 (d9) SM	SM	pozitívny	5,19	701,60	184,10
SM(d35:1)	18:1 (d9) SM	SM	pozitívny	6,53	717,60	184,10
SM(d36:0)	18:1 (d9) SM	SM	pozitívny	7,30	733,60	184,10
SM(d36:1)	18:1 (d9) SM	SM	pozitívny	7,00	731,60	184,10
SM(d36:2)	18:1 (d9) SM	SM	pozitívny	6,22	729,60	184,10
SM(d38:1)	18:1 (d9) SM	SM	pozitívny	7,93	759,60	184,10
SM(d38:2)	18:1 (d9) SM	SM	pozitívny	7,22	757,60	184,10
SM(d39:1)	18:1 (d9) SM	SM	pozitívny	8,49	773,70	184,10
SM(d39:2)	18:1 (d9) SM	SM	pozitívny	7,78	789,70	184,10
SM(d40:1)	18:1 (d9) SM	SM	pozitívny	8,80	787,70	184,10
SM(d40:2)	18:1 (d9) SM	SM	pozitívny	8,15	785,70	184,10
SM(d40:3)	18:1 (d9) SM	SM	pozitívny	7,27	783,60	184,10
SM(d18:0/22:3)	18:1 (d9) SM	SM	pozitívny	7,17	783,64	266,28
SM(d41:1)	18:1 (d9) SM	SM	pozitívny	9,21	801,70	184,10
SM(d41:2)	18:1 (d9) SM	SM	pozitívny	8,59	799,70	184,10
SM(d42:1)	18:1 (d9) SM	SM	pozitívny	9,58	815,70	184,10
SM(d18:1/24:1)	18:1 (d9) SM	SM	pozitívny	9,58	813,68	264,27
SM(d42:3)	18:1 (d9) SM	SM	pozitívny	8,12	811,70	184,10
SM(d42:4)	18:1 (d9) SM	SM	pozitívny	7,41	809,70	184,10
SM(d42:5)	18:1 (d9) SM	SM	pozitívny	6,13	807,60	184,10
SM(d43:1)	18:1 (d9) SM	SM	pozitívny	9,89	829,70	184,10
SM(d43:2)	18:1 (d9) SM	SM	pozitívny	9,08	827,70	184,10
SM(d44:1)	18:1 (d9) SM	SM	pozitívny	10,25	843,70	184,10
SM(d44:2)	18:1 (d9) SM	SM	pozitívny	9,49	841,70	184,10
SM(d44:3)	18:1 (d9) SM	SM	pozitívny	8,91	839,70	184,10

ESI, elektrosprej; Q1, *m/z* molekulového iónu; Q3, *m/z* produktového iónu; FA, voľná masťná kyselina; PI, fosfatidylinozitol; CE, cholesterol ester; Cer, ceramid; HexCer, hexozylceramid; LPC, lyzofosfatidylcholin; LPE, lyzofosfatidyletanolamin; PC, fosfatidylcholin; PC (O-/P-), fosfatidylcholin s akyl/alkenyl éterovým substituentom; PE, fosfatidyletanolamin; PE (O-/P-) fosfatidyletanolamin s akyl/alkenyl éterovým substituentom; SM, sfingomyelín.

4.2 Viacrozmerná štatistická analýza

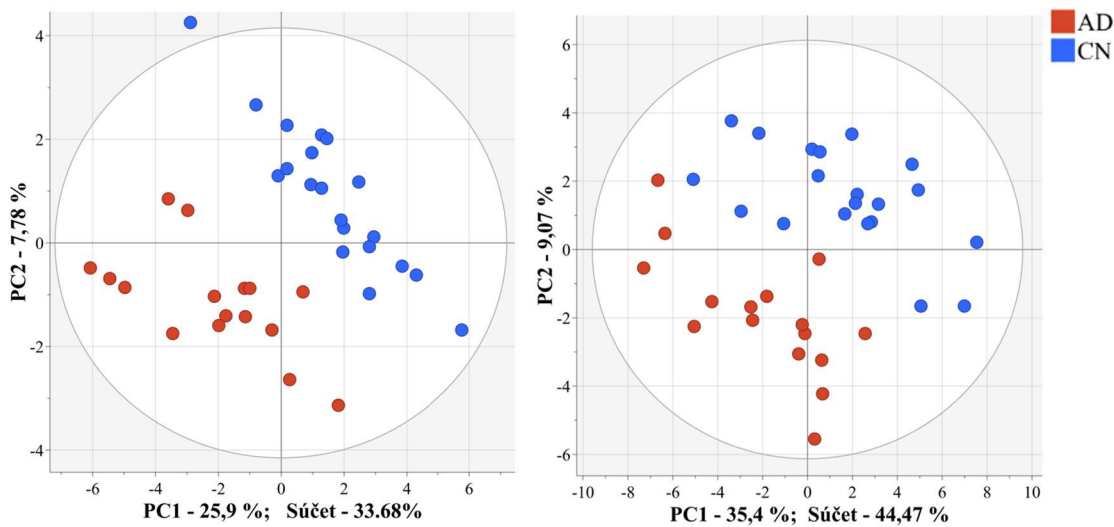
4.2.1 Vyhodnotenie AD pacientov a kontrol

Pomocou nesupervizovanej metódy PCA (Obr. 18) metabolomických a lipidomických dát, nedošlo k úplnému rozdeleniu vzoriek do skupín: AD pacientov a kontrol (CN). Vzorky oboch skupín sa prevažne prekrývali, avšak ich čiastočná separácia bola zrejmä predovšetkým u metabolomiky a v malej miere u lipidomických dát. V metabolomickej analýze vyšli hodnoty hlavných komponent: PC1- 27,9 %; PC2- 11,4 % a ich súčet bol - 39,3 %. V lipidomickej analýze vyšli hodnoty hlavných komponent nasledovne: PC1: 36,9 %; PC2: 11,0 % a súčet: 50,6 %.



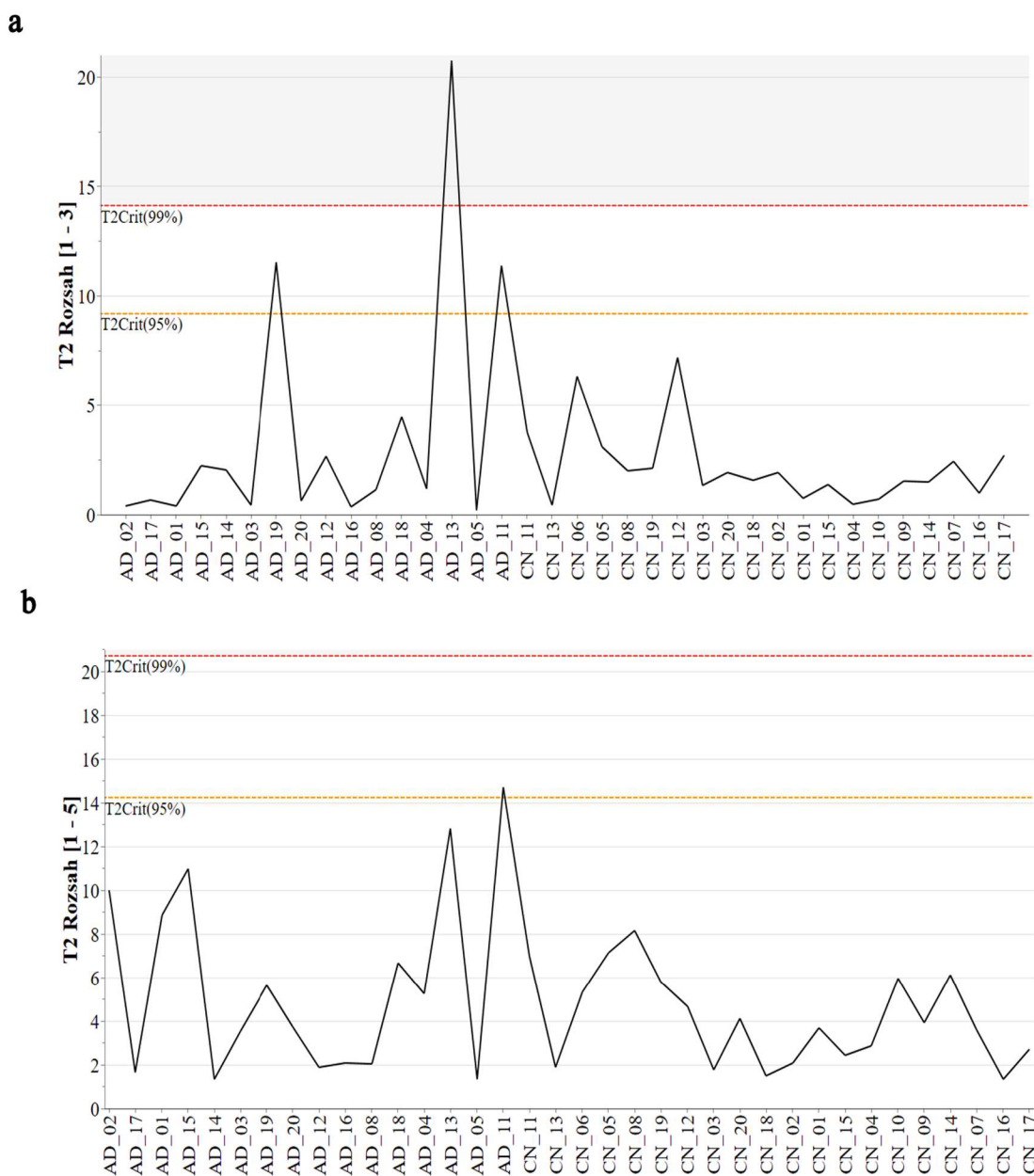
Obr. 18: Nesupervizovaná analýza hlavných komponent (PCA) metabolomických (vľavo) a lipidomických (vpravo) dát pacientov s Alzheimerovou chorobou (AD - červená) porovnaných s kontrolnými vzorkami (CN - modrá).

Supervizovanou metódou PLS-DA (Obr. 19), na rozdiel od tej nesupervizovanej, došlo k jasnému rozdeleniu vzoriek AD pacientov a kontrol do jednotlivých skupín v prípade metabolomickej (vľavo) aj lipidomickej analýzy (vpravo). Vzorky skupín sa vzájomne neprekrývali. U študovaných skupín ide teda predpokladať, že boli rozdielne podľa rozdielneho metabolického a lipidového profilu. Hodnoty hlavných komponent boli pre metabolomiku: PC1- 25,9 %; PC2- 7,78 % a ich súčet- 33,68 % a pre lipidomiku: PC1- 35,4 %; PC2- 9,07 % a ich súčet- 44,47 %.



Obr. 19: Supervizovaná diskriminačná analýza najmenších štvorcov (PLS-DA) metabolomických (vľavo) a lipidomických (vpravo) dát pacientov s Alzheimerovou chorobou (AD - červená) porovnaných s kontrolnými vzorkami (CN - modrá).

Hotelling's T2 testom boli určené podozrivo odľahlé (>95%) a odľahlé vzorky (>99%). Pre cieľnú metabolomickú analýzu boli vzorky AD_19 a AD_11 ako podozrivo odľahlé a vzorka AD_13 ako odľahlá (Obr. 20a). Pre cieľnú lipidomickú analýzu vyšla vzorka AD_11 ako podozrivo odľahlá (Obr. 20b).



Obr. 20: Hotelling's T2 test pre metabolomickú (a) a lipidomickú (b) analýzu vzoriek pacientov s AD a kontrol. Na ose y je znázornený rozsah T2 a na ose poradie študovaných vzoriek. Vzorky s vrcholmi piku nad žltou čiarou (95%) boli podozrivo odľahlé a nad červenou čiarou (99%) boli hodnotené ako odľahlé.

Pre vyhodnotenie, či išlo skutočne o podozrivo odľahlé a odľahlé vzorky boli podrobne prehľadane dostupné klinické informácie o skúmaných subjektoch. Všetky údaje boli zhrnuté do prílohového materiálu (Príloha 1). U pacientky AD_19 neboli zistené žiadne abnormality, ktoré by mohli mať vplyv na zmeny metabolizmu a lipidómu AD. Oproti tomu pacientka so vzorkou AD_11 mala najnižšie BMI (17) a odľahlá vzorka AD_13 patrila pacientke s najvyšším vekom (92 rokov) z tejto štúdie. Metabolizmus týchto pacientiek mohol byť čiastočne ovplyvnený. Vplyv BMI a veku na metabolizmus už bol študované (Yu et al., 2012; Moore et al., 2014; Carlsson et al., 2021).

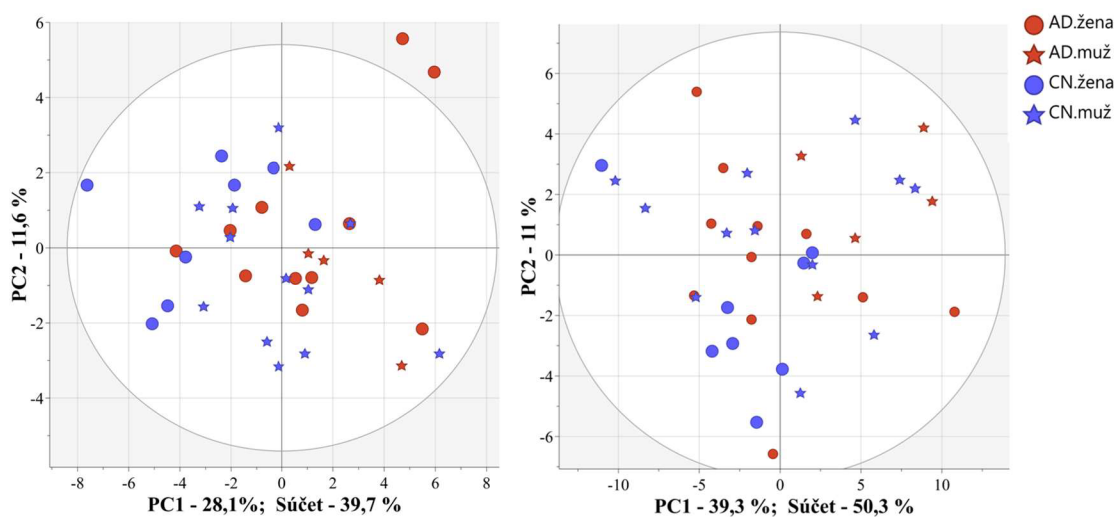
Z tohto dôvodu bolo štúdium metabolómu a lipidómu pacientov s AD rozšírené o sledovanie vplyvu pohlavia, veku a BMI. Vzorky boli pre štatistickú analýzu rozdelené mimo AD a CN skupín navyše podľa týchto kritérií. Na základe týchto rozdelení a preskúmaní viacrozmernej a jednorozmernej analýzy, neboli pozorované žiadne významné zmeny podľa veku a BMI. Preto boli vzorky AD_11 a AD_13 ponechané v pôvodnom súbore dát.

Na druhú stranu pri rozdelení vzoriek podľa pohlavia dochádzalo k rozdeleniu metabolómu a lipidómu medzi ženy a mužov s AD. Z toho dôvodu sú nasledujúce výsledky a diskusia zamerané na porovnanie zmien medzi AD pacientov s kontrolami príslušného pohlavia.

4.2.2 Vyhodnotenie AD pacientov a kontrol rozdelených podľa pohlavia

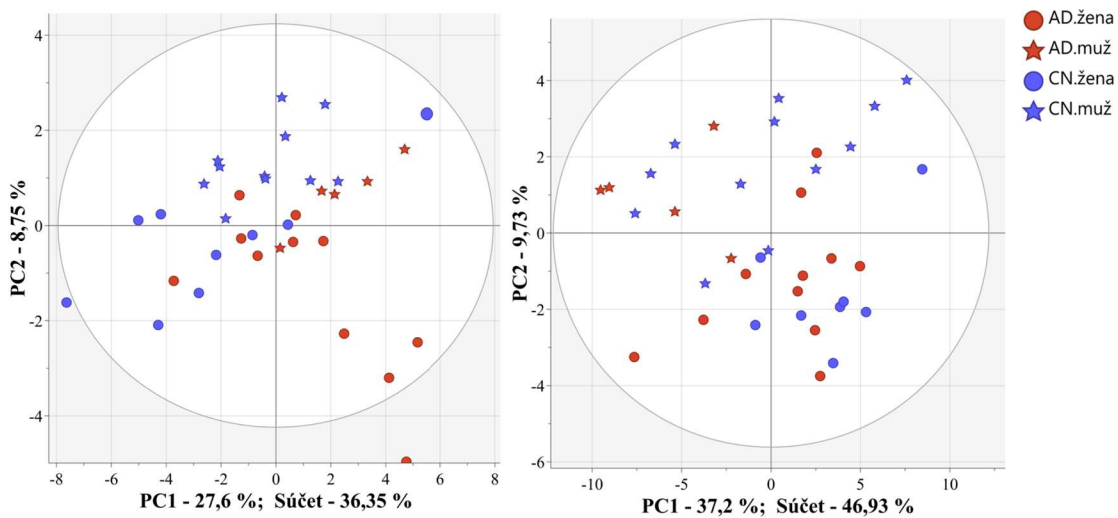
Vzorky boli rozdelené podľa pohlavia nasledovne: ženy s AD (AD.ženy), muži s AD (AD.muži), ženy kontroly (CN.ženy) a muži kontroly (CN.muži).

Prostredníctvom nesupervizovanej metódy PCA (Obr. 21) v metabolomickej štúdií došlo k čiastočnému oddeleniu vzoriek žien s AD od žien kontrol a takisto aj mužov s AD od mužov kontrol. V lipidomickej štúdií sa opäť čiastočne delili AD ženy od CN žien a AD muži od CN mužov. Hodnoty hlavných komponent pre cieleňú metabolomickú analýzu vyšli: PC1- 28,1 %; PC2- 11,6 % a ich súčet- 39,7 % a pre cieleňú lipidomickú analýzu: PC1- 39,3 %; PC2- 11 % s ich súčtom- 50,3 %.



Obr. 21: Nesupervizovaná metóda PCA metabolomických (vľavo) a lipidomických (vpravo) dát žien s Alzheimerovou chorobou (AD.ženy - červený kruh), mužov s Alzheimerovou chorobou (AD.muži - červená hviezda), ženských kontrolných vzoriek (CN.ženy - modrý kruh) a mužských kontrolných vzoriek (CN.muži - modrá hviezda).

Za použitia supervizovanej analýzy PLS-DA (Obr. 22) metabolomických dát došlo k výraznejšiemu oddeleniu žien s AD od ženských kontrolných vzoriek a mužov s AD od mužských kontrolných vzoriek. V lipidomických dátach došlo k čiastočnému oddeleniu AD mužov a CN mužov, avšak u ženských vzoriek došlo iba k nepatrnému oddeleniu AD pacientiek a kontrol. Hodnoty hlavných komponent boli pre metabolomiku: PC1- 27,6 %; PC2- 8,75 % a ich súčet- 36,35 % a pre lipidomiku: PC1- 37,2 %; PC2- 9,73 % a ich súčet- 46,93 %.



Obr. 22: Supervizovaná metóda PLS-DA metabolomických (vľavo) a lipidomických (vpravo) dát žien s Alzheimerovou chorobou (AD.žena - červený kruh), mužov s Alzheimerovou chorobou (AD.muž - červená hviezda), ženských kontrolných vzoriek (CN.žena - modrý kruh) a mužských kontrolných vzoriek (CN.muž - modrá hviezda).

4.3 Jednorozmerná štatistická analýza

Podľa Shapiro-Wilk testu normality nemala ani jedna zo skupín normálne rozdelenie. Preto bol použitý Wilcoxon test, z ktorého p-hodnota $< 0,05$ značila signifikantný metabolit/lipid.

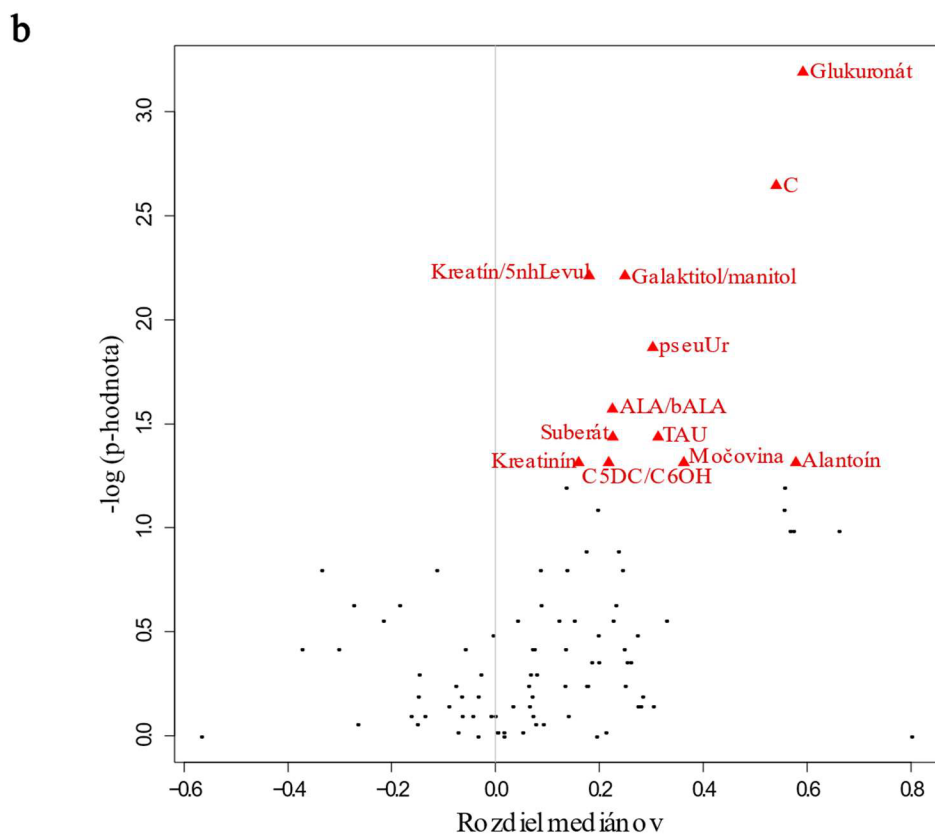
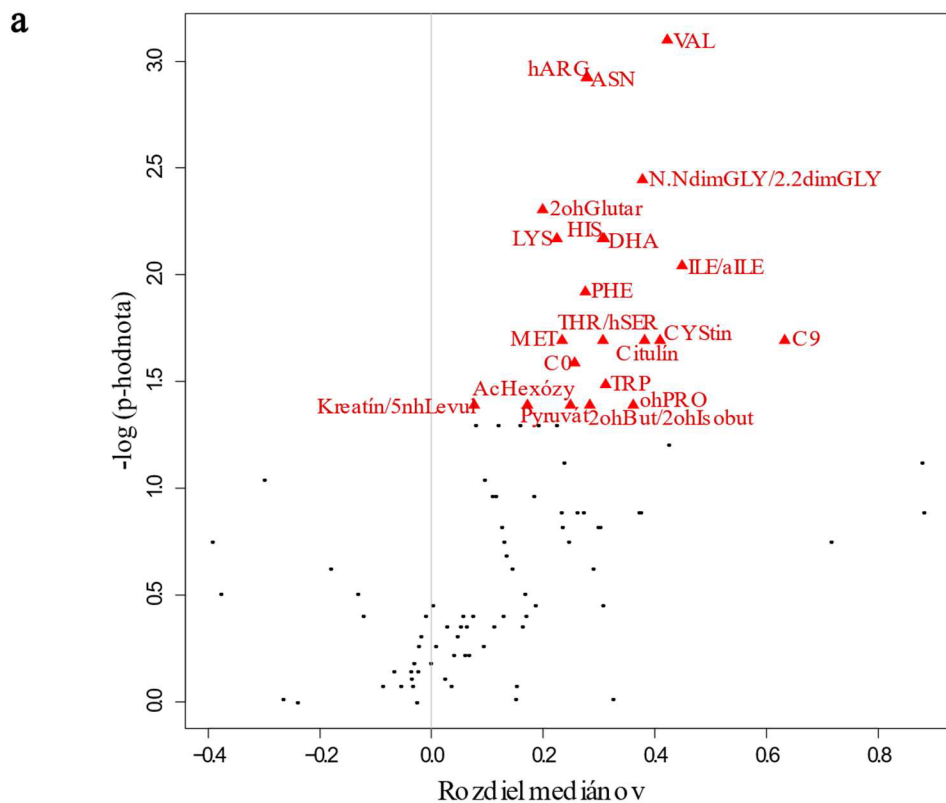
4.3.1 Vyhodnotenie AD pacientov a kontrol rozdelených podľa pohlavia

Pre vizualizáciu výsledkov cieľenej metabolomickej/lipidomickej analýzy a porovnania zmien na úrovni konkrétnych metabolitov/lipidov medzi AD pacientami a kontrolami (žien a mužov zvlášť) boli vytvorené Volcano grafy (Obr. 23 a Obr. 27), kde sú znázornené iba významne ovplyvnené analyty.

4.3.1.1 Výsledky cieľenej metabolomickej analýzy

Z cieľenej metabolomickej štúdie vyšlo u žien s AD oproti kontrolám celkovo 22 signifikantne zvýšených metabolitov (Obr. 23a). Boli medzi nimi aminokyseliny a ich deriváty: VAL, ASN, LYS, HIS, ILE/aILE, PHE, MET, TRP, THR/hSER, hARG, ohPRO, cystín, N,N-dimetylglycín/2,2-dimetylglycín, citrulín; amíny a organické kyseliny (kreatín/5nhLevul, pyruvát, 2ohGlutar, 2ohBut/2ohIsobut, DHA); dva acylkarnitíny: C9, C0 a AcHexózy patrili k sacharidom. Tieto metabolity boli zhrnuté do tabuľky a zoradené podľa p-hodnoty (Tab. 17).

Metabolóm mužov s AD bol oproti kontrolám významne ovplyvnený zvýšenými hladinami 12 metabolitov (Obr. 23b). Jednalo sa o aminokyseliny a amíny: ALA/bALA, TAU, močovina, alantoin, kreatinín, kreatín/5nh2Levul; acylkarnitíny a sacharidy C5.DC/C6.OH, galaktitol/manitol, glukuronát a pyrimidinové metabolity: C, pseuUr. Metabolity sú opäť zoradené v tabuľke (Tab. 18).



Obr. 23: Volcano grafy porovnávajúce zmeny v hladinách metabolitov pre ženy s AD (a) a mužov s AD (b) s príslušnými CN skupinami. Osa y odpovedá zápornému logaritmu p-hodnôt a osa x predstavuje rozdiel mediánov. Červeným trojuholníkom sú vyznačené metabolity, ktoré mali zvýšené hladiny.

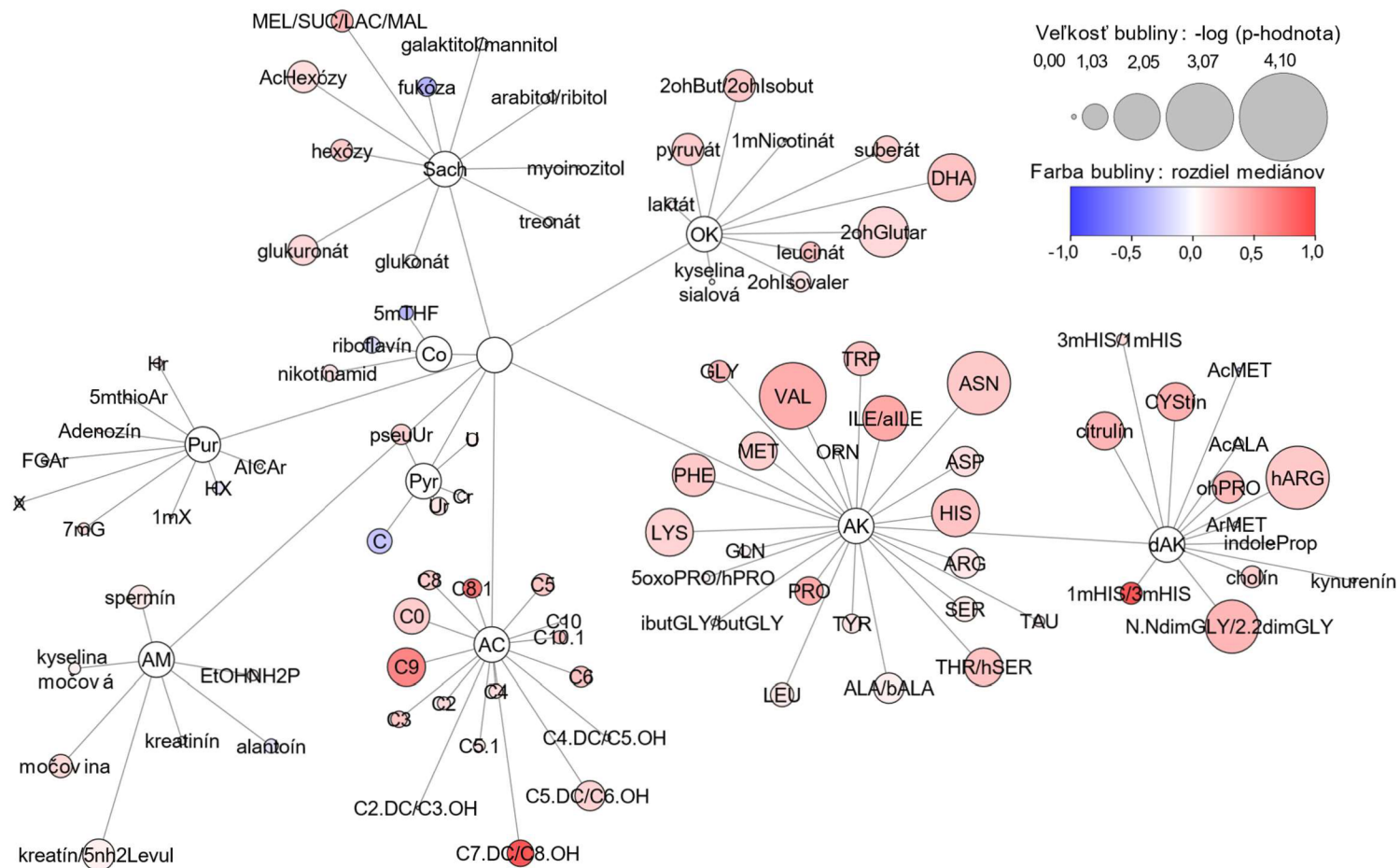
Tab. 17: Zoznam signifikantných metabolitov pre ženy s AD v porovnaní s kontrolami zoradené podľa p-hodnoty.

metabolit	p-hodnota	rozdiel mediánov
VAL	0,001	0,422
ASN	0,001	0,280
hARG	0,001	0,278
N.NdimGLY/ 2.2dimGLY	0,004	0,378
X2ohGlutar	0,005	0,199
LYS	0,007	0,225
HIS	0,007	0,307
DHA	0,007	0,309
ILE/aILE	0,009	0,449
PHE	0,012	0,276
C9	0,020	0,632
MET	0,020	0,234
THR/hSER	0,020	0,307
citrulín	0,020	0,382
CYStín	0,020	0,409
C0	0,026	0,257
TRP	0,033	0,312
kreatín/5nh2Levul	0,041	0,077
ohPRO	0,041	0,362
X2ohBut/2ohIsobut	0,041	0,284
pyruvát	0,041	0,249
AcHexózy	0,041	0,172

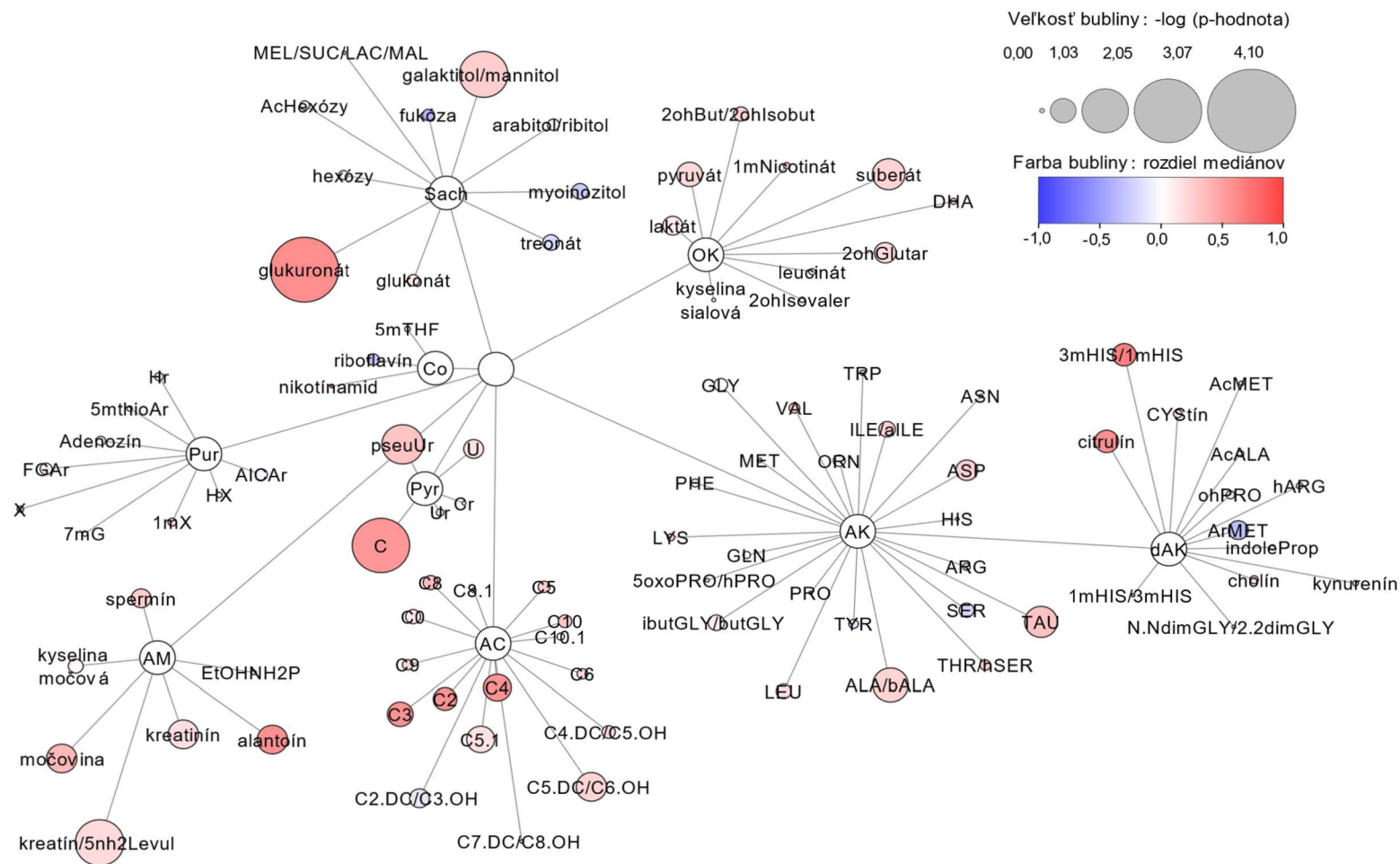
Tab. 18: Súhrn významných metabolitov pre mužov s AD v porovnaní kontrolami zoradené podľa p-hodnoty.

metabolit	p-hodnota	rozdiel mediánov
glukuronát	0,0006	0,5919
C	0,0023	0,5405
kreatín/ 5nh2Levul	0,0061	0,1807
galaktitol/ manitol	0,0061	0,2494
pseuUr	0,0136	0,3030
ALA/bALA	0,0268	0,2254
suberát	0,0365	0,2261
TAU	0,0365	0,3133
C5.DC/C6.OH	0,0485	0,2182
močovina	0,0485	0,3627
alantoin	0,0485	0,5784
kreatinín	0,0485	0,1603

Okrem toho boli vytvorené aj metabolomické mapy pre ženy (Obr. 24) a pre mužov (Obr. 25) s AD porovnané s CN skupinami, kde boli okrem významných zmien vizualizované všetky zmeny. Veľkosť bubliny znamená významnosť (čím väčšia bublina, tým väčšia hodnota záporného logaritmu p hodnoty) a farba bubliny značí zmenu v rozdiely mediánu (červená je zvýšená hladina a modrá znížená) pre pacientov s AD v porovnaní s kontrolami.

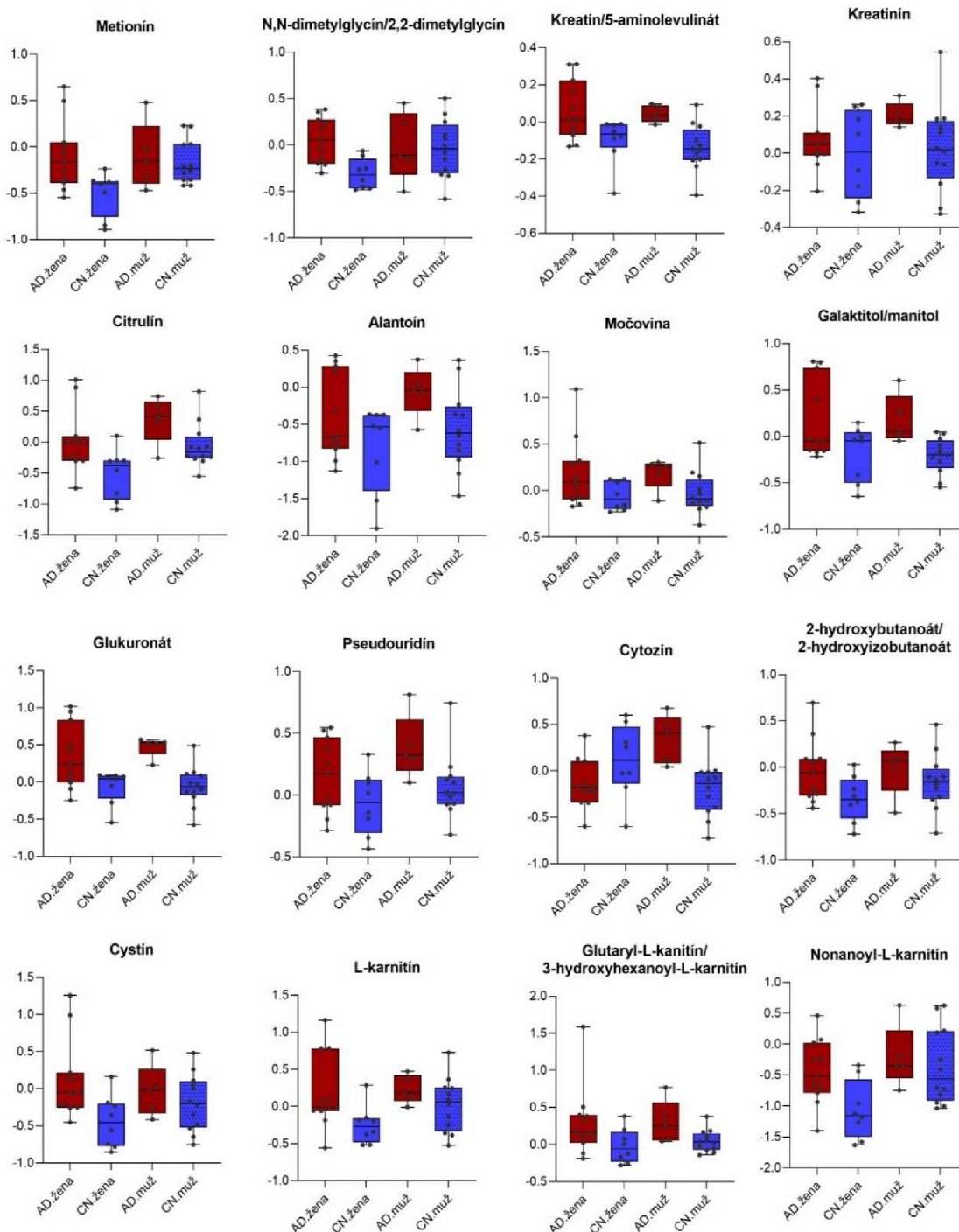


Obr. 24: Metabolická mapa vizualizovaná pomocou p-hodnoty a rozdielu mediánov (viď legenda), ktorá porovnáva metabolický profil žien s AD v porovnaní s kontrolami. AK, aminokyseliny; dAK, deriváty aminokyselín; AC, acykarnitíny; AM, amíny; Co, koenzýmy; OK, organické kyseliny; Pur, puríny; Pyr, pyrimidíny; Sach, sacharidy.



Obr. 25: Metabolická mapa vizualizovaná pomocou p-hodnoty a rozdielu mediánov (viď legenda), ktorá porovnáva metabolický profil mužov s AD v porovnaní s kontrolami. AK, aminokyseliny; dAK, deriváty aminokyselín; AC, acykarnitíny; AM, amíny; Co, koenzýmy; OK, organické kyseliny; Pur, puríny; Pyr, pyrimidíny; Sach, sacharidy.

Ďalej boli skonštruované krabicové grafy pre významné metabolity, ktoré sú diskutované v rámci kapitoly 5 Diskusia (Obr. 26). V krabicových grafoch boli vizualizované rozdiely v hladinách metabolitov medzi skupinami AD pacientov a kontrol rozdelených na pohlavia.

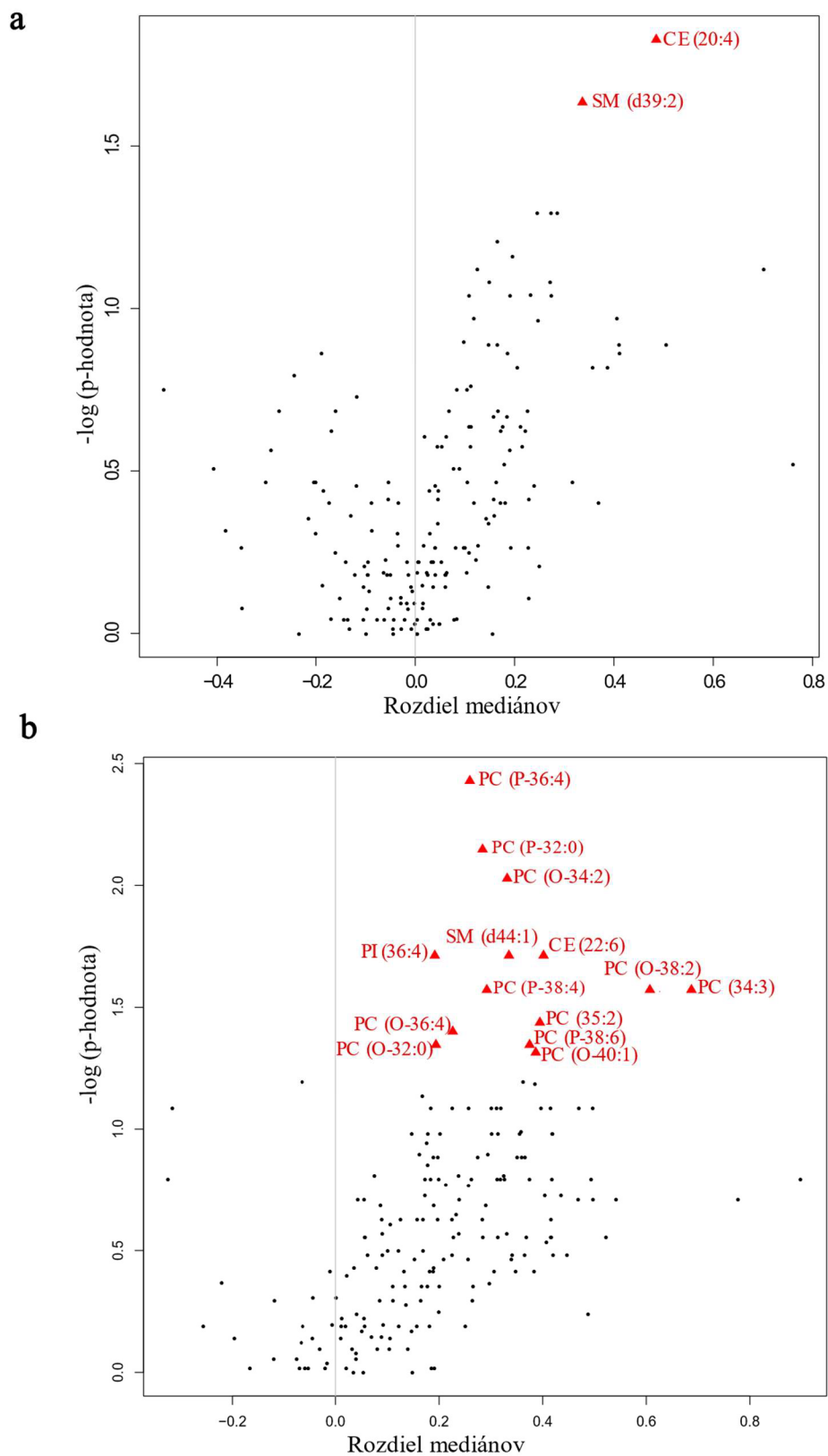


Obr. 26: Krabicové grafy pre vybrané významné metabolity, diskutované v kapitole 5 Diskusia.

4.3.1.2 Výsledky cieľenej lipidomickej analýzy

V cieľenej lipidomickej štúdií vyšli u žien s AD v porovnaní s kontrolami 2 významne zvýšené lipidy: CE (20:4) a SM (d39:2) (Obr. 27a a Tab. 19). Muži s AD v porovnaní s kontrolami mali signifikantne zvýšených 15 lipidov. Jednalo sa o glycerolfosfolipidy: PI (36:4), PC (34:3), PC (35:2), PC (O-32:0), PC (P-32:0), PC (O-34:2), PC (O-36:4), PC (P-36:4), PC (O-38:2), PC (P-38:4), PC (P-38:6), PC (O-40:1) a jeden cholesterol ester CE (22:6) a jeden sfingomyelín SM (d44:1) (Obr. 27b a Tab. 20).

Znovu boli pre posúdenie chovania každého lipidu vytvorené aj lipidomické mapy ako pre ženy s AD (Obr. 28), tak pre mužov s AD (Obr. 29) v porovnaní s kontrolami. Rovnako ako v metabolomických, tak aj v lipidomických mapách veľkosť bubliny značila p-hodnotu (čím väčšia bublina, tým významnejší lipid) a farba bubliny zmenu v rozdiely mediánu (červená je zvýšená hladina a modrá znížená pre pacientov s AD v porovnaní s kontrolami).



Obr. 27: Volcano grafy porovnávajúce zmeny v hladinách lipidov pre ženy s AD (a) a mužov s AD (b) s príslušnými CN skupinami. Osa y odpovedá zápornému logaritmu p-hodnôt a osa x predstavuje rozdiel mediánov. Červeným trojuholníkom sú vyznačené lipidy, ktoré mali zvýšené hladiny. FA, voľná masťná kyselina; CE, cholesterol ester; PC, fosfatidylcholín; PC (O/P), fosfatidylcholín s akyl/alkenyl éterovým substituentom; SM, sfingomyelín.

Tab. 19: Zoznam významných lipidov pre ženy s AD v porovnaní s kontrolami zoradené podľa p-hodnoty

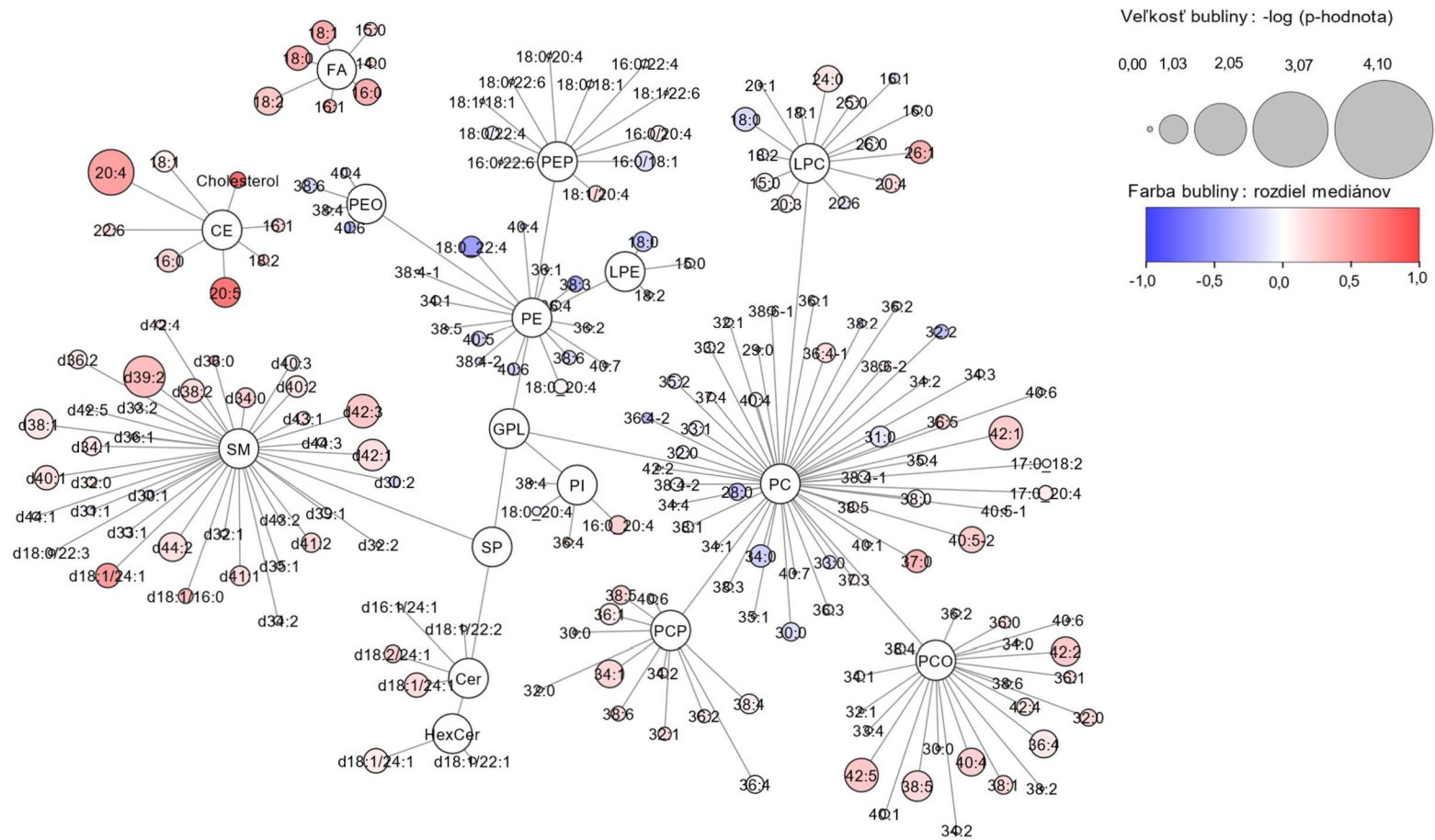
Lipid	p-hodnota	Rozdiel mediánov
CE (20:4)	0,015	0,485
SM (d39:2)	0,023	0,337

CE, cholesterol ester; SM, sfingomyelín.

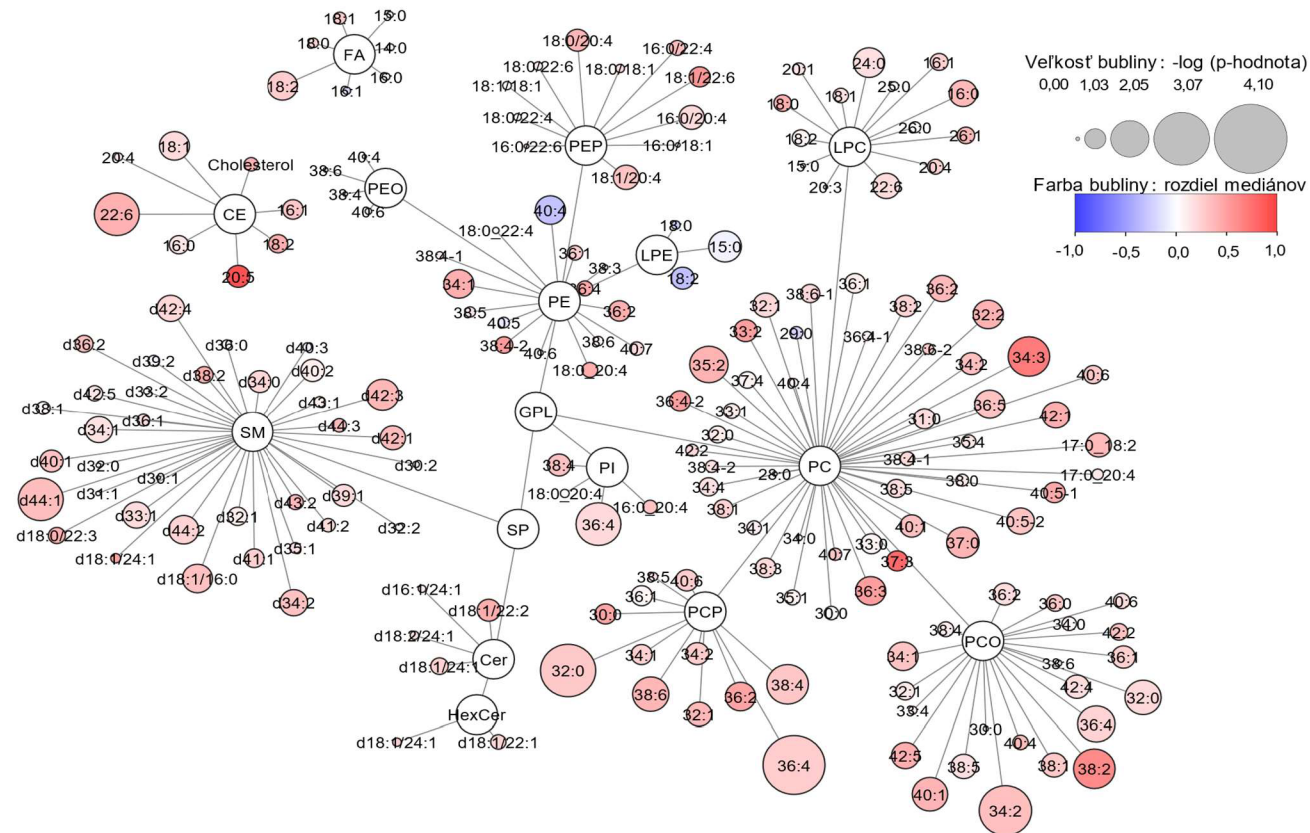
Tab. 20: Súhrn významných lipidov pre mužov s AD v porovnaní s kontrolami zoradené podľa p-hodnoty

Lipid	p-hodnota	Rozdiel mediánov
PC (P-36:4)	0,004	0,259
PC (P-32:0)	0,007	0,284
PC (O-34:2)	0,009	0,331
CE (22:6)	0,019	0,402
SM (d44:1)	0,019	0,335
PI (36:4)	0,019	0,192
PC (P-38:4)	0,027	0,292
PC (34:3)	0,027	0,687
PC (O-38:2)	0,027	0,607
PC (35:2)	0,037	0,395
PC (O-36:4)	0,040	0,226
PC (O-32:0)	0,045	0,194
PC (P-38:6)	0,045	0,375
PC (O-40:1)	0,049	0,387

FA, voľná masťná kyselina; CE, cholesterol ester; PC, fosfatidylcholín; PC (O/P), fosfatidylcholín s akyl/alkenyl éterovým substituentom; SM, sfingomyelín.

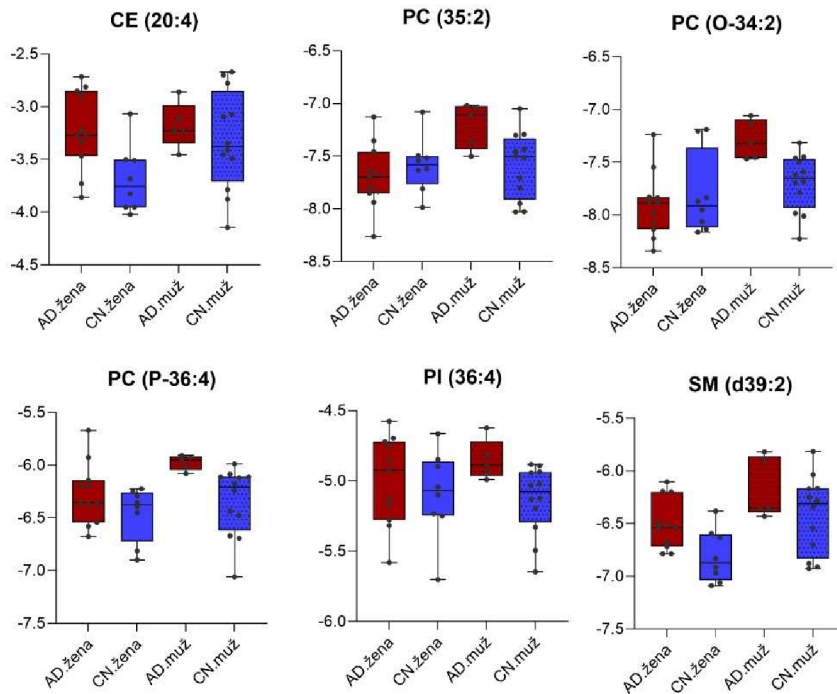


Obr. 28: Lipidomická mapa vizualizovaná pomocou p-hodnoty a rozdielu mediánov (viď legenda), ktorá porovnáva lipidomický profil žien s AD v porovnaní s kontrolami. FA, voľná masťná kyselina; CE, cholesterol ester; Cer, ceramid; HexCer, hexozylceramid; GPL, glycerolfosfolipid; LPC, lyzofosfatidylcholín; LPE, lyzofosfatidyletanolamín; PC, fosfatidylcholín; PC (O/P), fosfatidylcholín s akyl/alkenyl éterovým substituentom; PE, fosfatidyletanolamín; PE (O/P) fosfatidyletanolamín s akyl/alkenyl éterovým substituentom; SM, sfingomyelín; SP, sfingolipid.



Obr. 29: Lipidomická mapa vizualizovaná pomocou p-hodnoty a rozdielu mediánov (viď legenda), ktorá porovnáva lipidomický profil mužov s AD v porovnaní s kontrolami. FA, voľná masťná kyselina; CE, cholesterol ester; Cer, ceramid; HexCer, hexozylceramid; GPL, glycerolfosfolipid LPC, lyzofosfatidylcholín; LPE, lyzofosfatidyletanolamín; PC, fosfatidylcholín; PC (O-/P-), fosfatidylcholín s akyl/alkenyl éterovým substituentom; PE, fosfatidyletanolamín; PE (O-/P-) fosfatidyletanolamín s akyl/alkenyl éterovým substituentom; SM, sfingomyelín; SP, sfingolipid.

Krabicové grafy (Obr. 30) boli vytvorené pre zástupcov lipidových tried, ktoré sú komentované v nasledujúcej kapitole (viď kapitola 5 Diskusia). Ostatné významné lipidy z danej lipidovej triedy vykazovali rovnaké trendy ako zástupcovia týchto tried.



Obr. 30: Krabicové grafy pre vybraných zástupcov lipidových tried, diskutovaných v rámci kapitoly 5 Diskusia. CE, cholesterol ester; PC, fosfatidylcholín, PC (O-/P-) fosfatidylcholín s alkyl/alkenyl éterovým substituentom; SM, sfingomyelín.

5 DISKUSIA

Táto diplomová práca sa zameriava na cieľnú metabolomickú a lipidomickú štúdiu vzoriek mozgovomiešneho moku pacientov s Alzheimerovou chorobou. Boli zistené metabolity a lipidy významné pre ženy a mužov trpiacich AD v porovnaní s kontrolami.

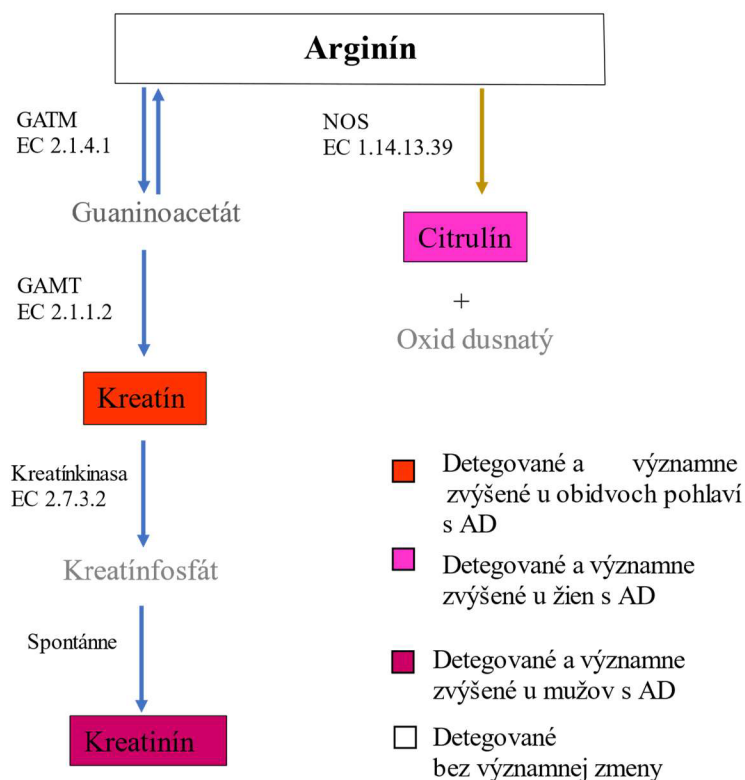
V cieľnej metabolomickej štúdií bolo celkovo detegovaných 95 metabolitov a v cieľnej lipidomickej analýze 189 lipidov. U týchto metabolitov a lipidov bola vykonaná viacrozmerná a jednorozmerná štatistická analýza. Najskôr bola aplikovaná nesupervizovaná metóda PCA a po nej supervizovaná metóda PLS-DA na vzorky zo skupín AD pacientov a kontroly. Nesupervizovanou metódou PCA došlo iba k čiastočnému oddeleniu vzoriek do týchto skupín, avšak supervizovanou metódou PLS-DA sa vzorky rozdelili medzi stanovené skupiny. Nasledovalo rozšírenie štúdie, spojené s rozdelením vzoriek mimo AD a CN skupiny navyše podľa pohlavia, pre určenie rozdielu v metabolóme a lipidóme patologických a zdravých jedincov. V cieľnej metabolomike bolo z výsledkov možné pozorovať čiastočné delenie vzoriek žien s AD od CN žien a mužov s AD od CN mužov. V PLS-DA došlo k úplnému oddeleniu týchto skupín. V cieľnej lipidomickej analýze sa prostredníctvom PCA aj PLS-DA čiastočne oddelili AD muži od mužských kontrolných vzoriek, avšak u ženského pohlavia došlo iba k nepatrnému oddeleniu podľa ochorenia.

Z jednorozmerného prístupu v rámci cieľnej metabolomickej štúdie boli u AD pacientov oproti kontrolám detegované významné metabolity zo skupín: acylkarnitíny, amíny, pyrimidíny, aminokyseliny a ich deriváty, organické kyseliny a sacharidy. Pomocou cieľnej lipidomiky bolo detegovaných niekoľko významných zmien aj v lipidóme, pričom išlo o významne zvýšené hladiny niektorých lipidových tried: CE, SM, PC a PC (O-/P-). Ďalej boli objavené rozdiely aj v metabolóme a lipidóme medzi pohlaviami pacientov s AD v porovnaní s príslušnými kontrolami. Tento poznatok potvrdzujú aj iné štúdie jednak u zdravých jedincov, ale aj u pacientov s Alzheimerovou chorobou (Czech et al., 2012, Krumsiek et al., 2015; Van der Velpen, 2019; Xu et al., 2021).

Okrem zistených zmien hladín metabolitov a lipidov je potrebné zmieniť možné poškodenie hematolikorovej bariéry, ktoré priamo ovplyvňovalo zloženie CSF pri AD. Jednak bol pravdepodobne narušený transport niektorých metabolitov cez bariéru, ale aj dochádzalo k uvoľňovaniu lipidov z jej membrány. Existuje niekoľko možných vysvetlení. Poškodenie tejto bariéry mohlo byť okrem iného spôsobené oxidačným stresom, spôsobujúcim oxidáciou transportérov v choroidných epitelových bunkách. Ďalšou možnosťou mohlo byť zvýšenie paracelulárneho transportu, tým že A β 42 oligoméry spúšťali kaskádu reakcií, ktoré mali podiel na poškodení tesných spojov medzi choroidnými epitelovými bunkami (Perez-Gracia et al., 2009; Brkic et al., 2015). V neposlednej rade sa mohol p-tau proteín zhlukovať vo fenestrovanej kapiláre choroidného plexu čo najpravdepodobnejšie spôsobilo zmeny v transporte metabolitov z týchto kapilár do CSF (Raha-Chowdhury et al., 2019).

Z hľadiska metabolómu bolo najviac signifikantných zmien sledovaných u aminokyselín. Napríklad bola zistená významne zvýšená hladina metionínu u pacientiek s AD v porovnaní s kontrolami (Obr. 26). Zvýšená hladina tohto metabolitu už bola v CSF AD pacientov pozorovaná (Kaddurah-Daouk et al., 2013). Tento patologický jav mohol súvisieť so zníženou aktivitou cholínacetyltransferasy a zníženým množstvom acetylcholínu, čo už bolo taktiež preukázané v spojitosti s AD (Richter et al., 1980). Na základe toho mohlo dochádzať k akumulácii cholínu (Sims et al., 1983). Hoci hladina cholínu nebola významne zmenená, cholín sa pravdepodobne metabolizoval na metionín v jedno-uhlíkovom metabolizme spojeného s folátovým cyklom. Najskôr z cholínu za účasti enzýmu cholínoxidasy (EC 3.1.1.27) vzniká betaín, z neho prostredníctvom enzýmu betainhomocysteinmetyltransferasy (EC 2.1.1.5) je produkovaný metionín a dimetyl-glycín, ktorý mal taktiež zvýšenú hladinu u pacientiek s AD v porovnaní s kontrolami.

Jednou zo silne zasiahnutých biochemických dráh u AD pacientov (mužov aj žien) bol metabolizmus aminokyseliny arginínu (Obr. 31) aj keď samotný arginín nevykazoval signifikantné zmeny. Medzi patologické procesy, ktoré prebehli priamo v tejto časti metabolizmu patrili zmeny v kreatínovej dráhe a jednej z reakcií močovínového cyklu.



Obr. 31: Metabolické dráhy ovplyvnené v rámci metabolizmu arginínu. Neoramované metabolity so šedým textom neboli detegované v rámci tejto diplomovej práce. Modrá šípka znamená prepojenie arginínu s kreatínovou dráhou a oranžová značí časť močovínového cyklu priebehajúca aj v mozgu. GATM, glycinamidinotransferasa; GAMT, guaninoacetát-N-metyltransferasa; ODC, ornitindekarboxylasa; NOS, syntasa oxidu dusnatého.

Najdôležitejšou funkciou kreatínu je jeho metabolizácia na kreatínfosfát za účasti ATP a enzýmu kreatínkinasy (EC 2.7.3.2) (Obr. 31). Kreatínfosfát slúži ako zásobník fosfátu na syntézu ATP v prípade jeho nedostatku z iných reakcií. V mozgoch pacientov s AD bola zistená nižšia aktivita izoformy tohto enzýmu, spôsobená modifikáciou jej cysteínových zvyškov prostredníctvom ROS (Smith et al., 1991; David et al., 1998; Stachowiak et al., 1998; Aksenov et al., 2000). Znížená aktivita kreatínkinasy mohla byť ešte spôsobená aj ako dôsledok nedostatku ATP z dôvodu narušenia dýchacieho reťazca u AD pacientov (Parker & Parks, 1995; Maurer et al., 2000; Bubber et al., 2005). V predloženej práci bola zistená zvýšená hladina kreatínu u pacientov s AD bez rozdielu na pohlavie a kreatinínu u mužov s AD (Obr. 26). Akumulácia kreatínu v CSF mohla nastať z jeho zmienenej zníženej metabolizácie na kreatínfosfát. Oproti tomu kreatinín bol pravdepodobne vo zvýšenej miere transportovaný cez poškodenú hematolikvorovú bariéru (Johanson et al., 2018; Ott et al., 2018). Rozdiely v hodnotách kreatínu medzi ženami a mužmi sú známe aj u zdravých jedincov (Thomas et al., 2012).

Citrulín je produktom pri reakcii sprostredkovanej enzýmom syntasa oxidu dusnatého (NOS, EC 1.14.13.39) z arginínu za vzniku oxidu dusnatého (NO) (Obr. 31). V mozgu je tento enzým exprimovaný v troch izoformách ako: endoteliálna (eNOS, prítomná v endotelových bunkách), neurónova (nNOS, prítomná v neurónoch) a indukibilná (iNOS, indukovaná v neurónoch, mikrogliách a astrocytoch po ich aktivácii). Okrem iNOS sú ostatné dve konštitutívne exprimované a závislé od koncentrácie Ca^{2+} (Zhu, et al., 2007). Zvýšená hladina citrulínu u pacientiek s AD mohla byť spôsobená upreguláciou NOS. Špecificky u žien bola hlásená zvýšená hladina tohto metabolitu aj v štúdií Czech et al. (2010), avšak nie je objasnené prečo tomu dochádza iba u tohto pohlavia. Zvýšená aktivita iNOS a eNOS v mozgovej kôre modelových organizmov: potkanov a myši s vyvolaným AD bol dôsledkom jej zvýšenej expresie v reaktívnych astrocytoch. Astrocyty v mozgu sa stávajú reaktívnymi pri neurozápale ako dôsledok prítomnosti neurofibrilárnych spleťí a A β plakov (Haas et al., 2002; Lüth et al., 2001). Zvýšenou aktivitou tohto enzýmu zároveň dochádza k zvýšenej produkcii NO, podieľajúceho sa na zvýšení oxidatívneho stresu a na poškodení neurónov (Krumova & Cosa, 2016).

Ďalším významnými amínmi (mimo argininový metabolizmus v mozgu) pre mužov s AD boli alantoín a močovina (Obr. 26). Alantoín nebol doposiaľ detegovaný v CSF AD pacientov. Avšak jeho zvýšené hladiny v CSF boli detegované pri meningitíde, ktorá taktiež spôsobuje neurozápal (Becker et al., 2004). Alantoín je medziproduktom katabolizmu purínov prebiehajúcim v pečeni. Konečným produktom tohto metabolizmu je kyselina močová. Bolo zistené, že kyselina močová pôsobí ako neuroprotektívny antioxidant v mozgu postihnutého neurozápalom a podieľa sa na proliferácii neurónov v hipokampe a tým prispieva k zmierneniu dôsledkov ochorenia (Ahn et al., 2014; Tzeng et al., 2022). Je teda možné predpokladať, že alantoín mohol mať u AD pacientov obranný mechanizmus ako kyselina močová, u ktorej neboli pozorované významné zmeny. Do CSF a mozgu sa alantoín pravdepodobne transportoval krvou z pečene cez narušenú hematolikorovú bariéru (Becker et al., 2004).

Močovina je produktom enzýmovej reakcie katalyzovanej arginasou (EC 3.5.3.1). Jedná sa o reakciu močovínového cyklu, ktorý prebieha primárne v pečeni a hoci niektoré jeho časti môžu prebiehať aj v mozgu, nie je známe žeby syntéza močoviny v patrila medzi ne. Zvýšená hladina močoviny u mužov s AD mohla súvisieť s jej zvýšený

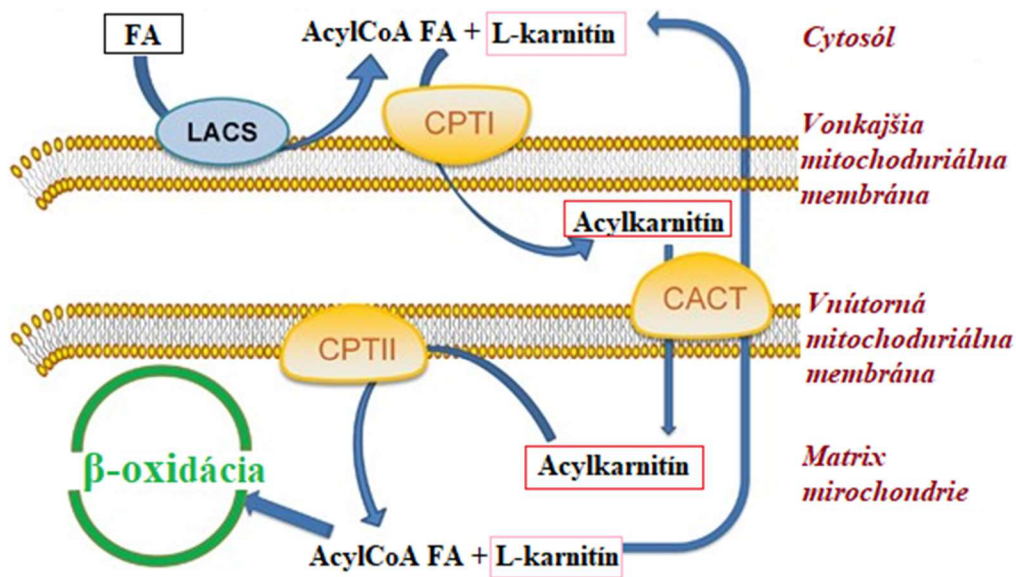
transportom z krvi cez poškodenú hematolikorovú bariéru (Johanson et al., 2018; Ott et al., 2018). Zvýšená močovina v CSF u pacientov s AD, hoci bez rozdelenia na pohlavia, bola detegovaná aj v ďalšej štúdií (Kaiser et al., 2010).

Galaktitol/manitol a glukuronát boli významne zmenenými metabolitmi opäť u mužov s AD v porovnaní s kontrolami (Obr. 26). Ich hladiny boli u týchto pacientov zvýšené. Galaktitol je alkoholový sacharid, ktorý vzniká ako produkt metabolického rozkladu galaktózy prostredníctvom enzýmu aldosa-reduktasy (EC 1.1.1.21). Jeho zvýšená aktivita bola nameraná v neurónoch v mozgovej kôre a hipokampe u pacientov s AD (Picklo et al., 2001). Mimo to akumulácia galaktitolu pôsobí neurotoxicky, čím prispieva k neurodegenerácii (Kashiwagi et al., 1994). Glukuronát, vzniká z prekursoru - glukózy. V pečeni, kde je jeho primárna syntéza, dochádza k jeho konjugácii so xenobiotikmi, ale aj steroidmi alebo bilirubínom. Následne sú tieto konjugáty transportované krvným obehom do obličiek, kde vďaka vysokej polarite glukuronátu je uľahčené vylučovanie xenobiotik, sterolov a bilirubínu (Bhagavan, 2002). Van der Velpen et al. (2019) detegovali zvýšenú hladinu glukuronátu v CSF u AD pacientov, avšak príčina jeho výskytu nebola objasnená. Keďže je prenášaný krvným obehom mohlo by ísť o jeho zvýšený transport cez porušenú hematolikorovú bariéru, čo bude musieť byť ešte predmetom iných štúdií.

Špecificky pre mužské pohlavie bol ešte zmenený metabolizmus pyrimidínov: zvýšenými hladinami pseudouridínu a cytozínu (Obr. 26). Avšak do dnešného dňa neboli diskutované ich zvýšené hladiny v CSF alebo mozgoch pacientov s Alzheimerovou chorobou a ani patologický účinok podieľajúci sa na tomto ochorení.

U žien s AD došlo k zvýšeniu hladín niektorých organických kyselín, vrátane 2-hydroxybutanoátu/2-hydroxyisobutanoátu (Obr. 26). Za oxidačného stresu sa v pečeni z homocysteínu tvorí cystatión, ktorý sa štiepi na cysteín, pričom 2-hydroxybutanoát vzniká ako vedľajší produkt. Cysteín sa následne prostredníctvom enzýmu cystínreduktasy (EC 1.8.1.6) môže metabolizovať na cystín, ktorého zvýšené hladiny boli opäť pozorované u AD pacientok. Pokiaľ bolo zvýšené množstvo 2-hydroxybutanoátu a cystínu v krvi, mohlo to spôsobiť ich zvýšenú translokáciu do CSF. Doposiaľ bol však 2-hydroxybutanoát so zvýšenou hladinou u AD pacientov detegovaný iba v moči a cystín nebol priamo spojený s AD (Pathan et al., 2021).

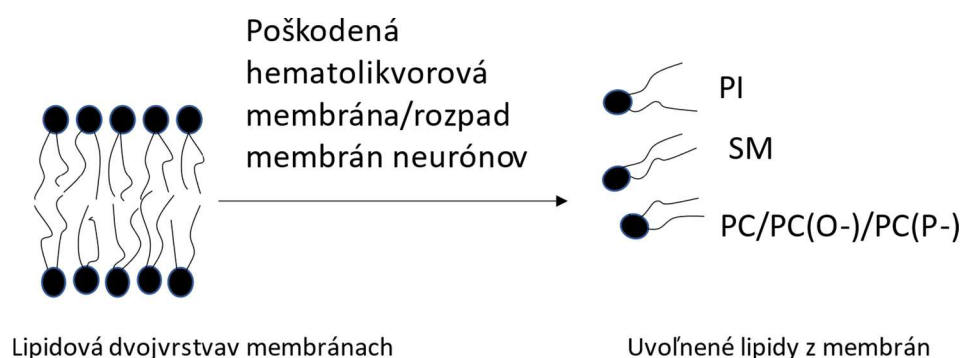
Acylkarnitíny vznikajú prostredníctvom enzýmu karnitínpalmitoyltransferasy I (EC 2.3.1.21) z karnitínu a acylCoA mastných kyselín (Obr. 32). Tieto zlúčeniny sú dôležité najmä pre presun voľných mastných kyselín (FA) cez mitochondriálnu membránu z cytozolu do mitochondriálneho matrixu, kde dochádza k ich β -oxidácii (www.lipidmaps.org, 14.4.2023). Skupina acylkarnitínov mala systematicky zvýšené hladiny, avšak iba niektoré z nich boli významné. U mužov s AD išlo o glutarylkarnitín/hydroxahexakarnitín (C5.DC/C6.OH) a u žien s AD bol významný voľný karnitín (C0) a nonanoylkarnitín (C9) (Obr. 26). U AD pacientov mohlo dôjsť k mitochondriálnej disfunkcii v mozgových bunkách, ktorá pravdepodobne prispela k množstvu ROS priamo v mitochondriách (Parker & Parks, 1995). Pravdepodobne to najskôr spôsobilo nahromadenie ROS, ktoré mohli oxidovať enzýmy (vrátane enzýmov podieľajúcich sa β -oxidácie mastných kyselín) v tomto bunkovom kompartmente a tým narušiť ich funkcie. To mohlo mať za následok akumuláciu L-karnitínu a acylkarnitínov v bunkách mozgu a pri rozpade membrán ich následne uvoľnenie do CSF. Toto tvrdenie bude však nutné ešte preskúmať (Lim et al., 2018). Tieto patologické zmeny boli zatiaľ pozorované najmä v hipokampe a mozgovej kôre (časti mozgu zasiahnuté pri AD) transgených myší s vyvolanou AD (González-Domínguez et al., 2015).



Obr. 32: Transport mastných kyselín z cytosólu do matrix mitochondrií prostredníctvom acylkarnitínov. Červeným rámom je vyznačený metabolit so zvýšenou hladinou u pacientov aj pacientok s AD a rúžový rám vyznačuje metabolit so zvýšenou hladinou nameranou iba u žien s AD. AcylCoA FA, acylkoenzým A mastných kyselín; CACT, karnitín-acylakarnitín translokasa; CPTI, karnitín palmitoyltransferasa I; CPTII, karnitín palmitoyltransferasa II (EC 2.3.1.21); LACS, acylkoenzým A syntetasa (EC 6.2.1.3). Prevzaté a upravené podľa (Qu et al., 2016).

Väčšina detegovaných signifikantných lipidov pravdepodobne pochádzala priamo z poškodenej fosfolipidovej membrány hematolikorovej bariéry a z rozpadajúcich sa neurónov (Obr. 33). V predloženej diplomovej práci bolo zistené, že z tohto dôvodu dochádzalo k výraznému zvýšeniu hladín jednotlivých lipidov a to najmä u mužov s AD: PC (P-36:4), PC (P-32:0), PC (P-38:4), PC (P-38.6), PC (O-34:2) PC (O-38:2), PC (O-36.4), PC (O-32:0), PC (O-40:1), PC (34:3), PC (35:2), SM (d44:1) a PI(36:4). Naopak pacientky s AD mali iba jeden takto signifikantne zvýšený lipid SM (39:2). Okrem skupín PC a PI, vykazovali spomínané skupiny lipidov aj systematické trendy u všetkých pacientov s AD oproti kontrolám. Skupiny PC a PI boli systematicky zvýšené iba u mužov trpiacich AD, čo je možné vysvetliť odchýlkami v lipidóme v pohlaviach (Podcasy & Epperson, 2016; Beyon et al., 2021; González Zarzar et al., 2022).

Z nich boli doposiaľ v CSF u pacientov s AD zistené iba zvýšené hladiny PC a SM (Kosicek et al., 2010; Koal et al., 2015; Karlíková et al., 2017; Dong et al., 2021). Okrem uvoľňovania z hematolikorovej bariéry mohli byť SM zvýšené aj z dôvodu miernej upregulácie *TMEM23*, génu pre enzým sfingomyelinsyntasy (EC 2.7.8.27), ktorý katalyzuje syntézu sfingomyelínu z Cer (Katsel et al., 2007). Niektoré štúdie uvádzali zvýšené hladiny Cer (uvoľneného z poškodených membrán) v CSF u AD pacientov, čo v tejto štúdií nebolo potvrdené (Fonteh et al., 2015; Mielke et al., 2014). Odpoveď organizmu na jeho zvýšenú hladinu mohla byť zvýšená aktivita sfingomyelinsyntasy, ktorá sa podieľala na jeho metabolizácii.



Obr. 33: Rozpad lipidovej dvojvrstvy. PI, fosaftidylinozitol; SM, sfingomyelin; PC, fosaftidylcholín; PC (O-/P-) fosaftidylcholín s alkyl/alkenyl éterovým substituentom.

Poslednou skupinou lipidov so signifikantnými zástupcami a systematickou zmenou boli cholesterol estery. Cholesterol prítomný v mozgu je z väčšej časti syntetizovaný *de novo* a z krvi ho pochádza minimum, kvôli selektivitě mozgových bariér. Voľný cholesterol je z veľkej časti uložený v membránach neurónov. Okrem iného je dôležitý

pre flexibilitu bunkových membrán (vrátane neurónov), biochemické procesy a zápalové reakcie. Nadbytočný cholesterol je v zdravej mozgovej tkaní spracovaný tromi metabolickými cestami: esterifikácia s voľnými mastnými kyselinami, priamy export z mozgu do krvi, alebo jeho konverzia na 24-hydroxycholesterol (Qian et al., 2022).

Na základe dát získaných v tejto diplomovej práci boli v CSF detegované výrazne zvýšené hladiny: CE (22:6) u mužov s AD a CE (20:4) u AD žien v porovnaní s kontrolami. V CSF pacientov s AD boli doposiaľ spozorované zvýšené hladiny 24-hydroxycholesterolu a 27-hydroxycholesterolu (Papassotiropoulos, 2002; Mateos et al., 2011; Benussi et al., 2017). Podľa autorov pravdepodobne pri apoptóze neurónov došlo k uvoľňovaniu cholesterolu z ich membrány do CSF, čo mohlo viesť k zvýšenej tvorbe 24-hydroxycholesterolu a 27-hydroxycholesterolu ako snaha o odstránenie nadbytočného cholesterolu. Z rovnakého dôvodu mohlo dôjsť aj k ďalšej esterifikácii cholesterolu, a tým pádom k zvýšeným hladinám cholesterol esterov v CSF. Avšak metóda použitá v tejto práci nevedela rozlíšiť izoméry a deriváty cholesterolu, a tým pádom ani cholesterol esterov, preto pre potvrdenie tejto hypotézy by bola potrebná špecifickejšia metóda.

6 ZÁVER

V tejto diplomovej práci bola vykonaná cieľená metabolická a lipidická analýza vzoriek mozgovomiešneho moku u pacientov s Alzheimerovou chorobou.

V teoretickej časti sa prvá kapitola zaoberala Alzheimerovou chorobou, biomarkermi na jej diagnostiku a patobiochemickými procesmi podieľajúcimi sa na jej rozvoji. Ďalej bol popísaný mozgovomiešny mok (vrátane jeho funkcie, zloženia a tvorby). Posledná kapitola bola venovaná metabolomickej a lipidomickej analýze.

V rámci experimentálnej časti práce bola pre komplexné vyhodnotenie výsledkov vykonaná cieľená metabolická a lipidická analýza vzoriek CSF získaných od 16 pacientov s AD a 20 zdravých jedincov (kontrol). V oboch štúdiách bola využitá kombinácia vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie s hmotnostným spektrometrom.

Spracovanie výsledkov bolo uskutočnené prostredníctvom nesupervizovanej a supervizovanej viacrozmernej analýzy a pomocou jednorozmernej analýzy. Pričom boli porovnané vzorky pacientov s AD oproti kontrolám, pre určenie metabolitov a lipidov charakteristických pre ochorenie a zároveň pre popis patobiochemických zmien spojených s AD. Pri podrobnom skúmaní výsledkov boli zistené trendy u niektorých metabolitov a lipidov z hľadiska pohlavia. Z tohto dôvodu bola vykonaná podrobnejšia interpretácia výsledkov, zameraná na rozdiely v metabolóme a lipidóme pacientov a pacientiek s AD.

Celkovo bolo zistených 22 významných metabolitov a 2 významné lipidy pre ženy s AD, zatiaľ čo pre mužov s AD v porovnaní s kontrolami bolo signifikantne zmenených 12 metabolitov a 15 lipidov. Všetky tieto významné metabolity a lipidy mali zvýšené hladiny u AD skupín oproti kontrolám. Niektoré metabolity (najmä močovina) a väčšina lipidov (PC, PC (O-/P-), PI a SM) súviseli s poškodenou hematolikorovou bariérou a rozpadom membrány neurónov. Toto poškodenie bolo pravdepodobne spôsobené účinkami tau proteínu, A β plakov a pôsobením oxidačného stresu. Ďalšie metabolity (citrulín, kreatín, kreatinín, acylkarnitíny) súviseli s narušenými biochemickými dráhami, pri ktorých pravdepodobne dochádzalo k zmenám aktivít určitých enzýmov najmä vplyvom oxidačného stresu alebo neurozápalu. K najviac postihnutým dráham patrili β -oxidácia mastných kyselín, argininová dráha a s ňou súvisiaca kreatínová dráha.

Štúdia prispela k odhaleniu významných metabolitov a lipidov pre pacientky a pacientov s AD. Zároveň boli interpretované patobiochemické procesy, ktoré boli buď príčinou alebo následkom ich zmien.

7 LITERATÚRA

- Ahn, Y. J., Park, S. J., Woo, H., Lee, H. E., Kim, H. J., Kwon, G., Gao, Q., Jang, D. S., & Ryu, J. H. (2014). Effects of allantoin on cognitive function and hippocampal neurogenesis. *Food and Chemical Toxicology*, 64, 210–216. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.11.033>
- Aksenov, M., Aksenova, M., Butterfield, D. A., & Markesbery, W. R. (2002). Oxidative Modification of Creatine Kinase BB in Alzheimer's Disease Brain. *Journal of Neurochemistry*, 74(6), 2520–2527. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2000.0742520.x>
- Alfaro, A. C., & Young, T. (2018). Showcasing metabolomic applications in aquaculture: A review. *Reviews in Aquaculture*, 10(1), 135–152. <https://doi.org/10.1111/raq.12152>
- Álvarez-Sánchez, B., Priego-Capote, F., & Luque de Castro, M. D. (2010). Metabolomics analysis I. Selection of biological samples and practical aspects preceding sample preparation. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 29(2), 111–119. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2009.12.003>
- Armstrong, D. (2016). Introduction to free radicals, inflammation, and recycling. V D. Armstrong & R. D. Stratton (Ed.), *Oxidative Stress and Antioxidant Protection* (s. 1–10). John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/9781118832431.ch1>
- Balazy, M. (2004). Eicosanomics: Targeted lipidomics of eicosanoids in biological systems. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*, 73(3–4), 173–180. <https://doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2004.03.003>
- Bhagavan, N. V. (2002). Carbohydrate Metabolism II: Gluconeogenesis, Glycogen Synthesis and Breakdown, and Alternative Pathways. V *Medical Biochemistry* (s. 275–305). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-012095440-7/50017-2>
- Becker, B. F., Kastenbauer, S., Ködel, U., Kiesel, D., & Pfister, H. W. (2004). Urate Oxidation in CSF and Blood of Patients with Inflammatory Disorders of the Nervous System. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, 23(8–9), 1201–1204. <https://doi.org/10.1081/NCN-200027469>
- Benussi, L., Ghidoni, R., Dal Piaz, F., Binetti, G., Di Iorio, G., & Abrescia, P. (2017). The level of 24-Hydroxycholesteryl Esters is an Early Marker of Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 56(2), 825–833. <https://doi.org/10.3233/JAD-160930>
- Bernstein, H.-G., & Müller, M. (1995). Increased immunostaining for l-ornithine decarboxylase occurs in neocortical neurons of Alzheimer's disease patients. *Neuroscience Letters*, 186(2–3), 123–126. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(95\)11301-C](https://doi.org/10.1016/0304-3940(95)11301-C)
- Blennow, K., Vanmechelen, E., & Hampel, H. (2001). CSF Total tau, A β 42 and Phosphorylated tau Protein as Biomarkers for Alzheimer's Disease. *Molecular Neurobiology*, 24(1–3), 087–098. <https://doi.org/10.1385/MN:24:1-3:087>
- Braak, H., & Braak, E. (1995). Staging of alzheimer's disease-related neurofibrillary changes. *Neurobiology of Aging*, 16(3), 271–278. [https://doi.org/10.1016/0197-4580\(95\)00021-6](https://doi.org/10.1016/0197-4580(95)00021-6)
- Bubber, P., Haroutunian, V., Fisch, G., Blass, J. P., & Gibson, G. E. (2005). Mitochondrial abnormalities in Alzheimer brain: Mechanistic implications. *Annals of Neurology*, 57(5), 695–703. <https://doi.org/10.1002/ana.20474>
- Byeon, S. K., Madugundu, A. K., Jain, A. P., Bhat, F. A., Jung, J. H., Renuse, S., Darrow, J., Bakker, A., Albert, M., Moghekar, A., & Pandey, A. (2021). Cerebrospinal fluid lipidomics for biomarkers of Alzheimer's disease. *Molecular Omics*, 17(3), 454–463. <https://doi.org/10.1039/D0MO00186D>
- Cadonic, C., Sabbir, M. G., & Albeni, B. C. (2016). Mechanisms of Mitochondrial Dysfunction in Alzheimer's Disease. *Molecular Neurobiology*, 53(9), 6078–6090. <https://doi.org/10.1007/s12035-015-9515-5>
- Canevari, L., Clark, J. B., & Bates, T. E. (1999). L-Amyloid fragment 25[^]35 selectively decreases complex IV activity in isolated mitochondria. *FEBS Letters*.
- Carlsson, H., Rollborn, N., Herman, S., Freyhult, E., Svenningsson, A., Burman, J., & Kultima, K. (2021). Metabolomics of Cerebrospinal Fluid from Healthy Subjects Reveal Metabolites Associated with Ageing. *Metabolites*, 11(2), 126. <https://doi.org/10.3390/metabo11020126>

- Coedert, M., Spillantini, M. C., Rutherford, D., & Crowther, R. A. (1989). Multiple Isoforms of Human Microtubule-Associated Protein Tau: Sequences and localization in Neurofibrillary Tangles of Alzheimer's Disease. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(89\)90210-9](https://doi.org/10.1016/0896-6273(89)90210-9)
- Colsch, B., Seyer, A., Boudah, S., & Junot, C. (2015). Lipidomic analysis of cerebrospinal fluid by mass spectrometry-based methods. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 38(1), 53–64. <https://doi.org/10.1007/s10545-014-9798-0>
- Contrepolis, K., Mahmoudi, S., Ubhi, B. K., Papsdorf, K., Hornburg, D., Brunet, A., & Snyder, M. (2018). Cross-Platform Comparison of Untargeted and Targeted Lipidomics Approaches on Aging Mouse Plasma. *Scientific Reports*, 8(1), 17747. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-35807-4>
- Crivelli, S. M., Giovagnoni, C., Visseren, L., Scheithauer, A.-L., de Wit, N., den Hoedt, S., Losen, M., Mulder, M. T., Walter, J., de Vries, H. E., Bieberich, E., & Martinez-Martinez, P. (2020). Sphingolipids in Alzheimer's disease, how can we target them? *Advanced Drug Delivery Reviews*, 159, 214–231. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2019.12.003>
- Czech, C., Berndt, P., Busch, K., Schmitz, O., Wiemer, J., Most, V., Hampel, H., Kastler, J., & Senn, H. (2012). Metabolite Profiling of Alzheimer's Disease Cerebrospinal Fluid. *PLoS ONE*, 7(2), e31501. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031501>
- Čajka, T., & Fiehn, O. (2016). Toward Merging Untargeted and Targeted Methods in Mass Spectrometry-Based Metabolomics and Lipidomics. *Analytical Chemistry*, 88(1), 524–545. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b04491>
- David, S., Shoemaker, M., & Haley, B. E. (1998). Abnormal properties of creatine kinase in Alzheimer's disease brain: Correlation of reduced enzyme activity and active site photolabeling with aberrant cytosol-membrane partitioning. *Molecular Brain Research*, 54(2), 276–287. [https://doi.org/10.1016/S0169-328X\(97\)00343-4](https://doi.org/10.1016/S0169-328X(97)00343-4)
- De Belleruche, J., Recordati, A., & Rose, F. C. (1984). Elevated levels of amino acids in the CSF of motor neuron disease patients. *Neurochemical Pathology*, 2(1), 1–6. <https://doi.org/10.1007/BF02834167>
- De Graaf, M. T., De Jongste, A. H. C., Kraan, J., Boonstra, J. G., Smitt, P. A. E. S., & Gratama, J. W. (2011). Flow cytometric characterization of cerebrospinal fluid cells. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry*, 80B(5), 271–281. <https://doi.org/10.1002/cyto.b.20603>
- Delange, E. (2004). Potential role of ABC transporters as a detoxification system at the blood?CSF barrier. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 56(12), 1793–1809. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2004.07.009>
- Devi, L., Prabhu, B. M., Galati, D. F., Avadhani, N. G., & Anandatheerthavarada, H. K. (2006). Accumulation of Amyloid Precursor Protein in the Mitochondrial Import Channels of Human Alzheimer's Disease Brain Is Associated with Mitochondrial Dysfunction. *The Journal of Neuroscience*, 26(35), 9057–9068. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1469-06.2006>
- Dincer, P. Y. (Ed.). (2016). *Alzheimers Disease Current and Future Perspectives*. OMICS International. <https://doi.org/10.4172/978-1-63278-067-6-68>
- Doherty, C. M., & Forbes, R. B. (n.d.). Diagnostic Lumbar Puncture. *The Ulster Medical Journal*, 83(4), 93-102. PMID: 25075138
- Dong, R., Darst, B. F., Deming, Y., Ma, Y., Lu, Q., Zetterberg, H., Blennow, K., Carlsson, C. M., Johnson, S. C., Asthana, S., & Engelman, C. D. (2021). CSF metabolites associate with CSF tau and improve prediction of Alzheimer's disease status. *Alzheimer's & Dementia: Diagnosis, Assessment & Disease Monitoring*, 13(1). <https://doi.org/10.1002/dad2.12167>
- Eckert, A., Keil, U., Marques, C. A., Bonert, A., Frey, C., Schüssel, K., & Müller, W. E. (2003). Mitochondrial dysfunction, apoptotic cell death, and Alzheimer's disease. *Biochemical Pharmacology*, 66(8), 1627–1634. [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(03\)00534-3](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(03)00534-3)
- Escartin, C., Galea, E., Lakatos, A., O'Callaghan, J. P., Petzold, G. C., Serrano-Pozo, A., Steinhäuser, C., Volterra, A., Carmignoto, G., Agarwal, A., Allen, N. J., Araque, A., Barbeito, L., Barzilai, A., Bergles, D. E., Bonvento, G., Butt, A. M., Chen, W.-T., Cohen-Salmon, M., ... Verkhratsky, A. (2021). Reactive astrocyte nomenclature, definitions, and future directions. *Nature Neuroscience*, 24(3), 312–325. <https://doi.org/10.1038/s41593-020-00783-4>

- Fiehn, O. (2002). Metabolomics—The link between genotypes and phenotypes. V C. Town (Ed.), *Functional Genomics* (s. 155–171). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-010-0448-0_11
- Fonteh, A. N., Chiang, J., Cipolla, M., Hale, J., Diallo, F., Chirino, A., Arakaki, X., & Harrington, M. G. (2013). Alterations in cerebrospinal fluid glycerophospholipids and phospholipase A2 activity in Alzheimer's disease. *Journal of Lipid Research*, 54(10), 2884–2897. <https://doi.org/10.1194/jlr.M037622>
- Fonteh, A. N., Ormseth, C., Chiang, J., Cipolla, M., Arakaki, X., & Harrington, M. G. (2015). Sphingolipid Metabolism Correlates with Cerebrospinal Fluid Beta Amyloid Levels in Alzheimer's Disease. *PLOS ONE*, 10(5), e0125597. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0125597>
- Francis, P. T. (2005). The Interplay of Neurotransmitters in Alzheimer's Disease. *CNS Spectrums*, 10(S18), 6–9. <https://doi.org/10.1017/S1092852900014164>
- Garnett, M. R. (2000). Early proton magnetic resonance spectroscopy in normal-appearing brain correlates with outcome in patients following traumatic brain injury. *Brain*, 123(10), 2046–2054. <https://doi.org/10.1093/brain/123.10.2046>
- Gadoth, N., & Goebel, H.-H. (Ed.). (2011). *Oxidative stress and free radical damage in neurology*. Humana Press.
- Gibson, G. E., Blass, J. P., Beal, M. F., & Bunik, V. (2005). The α -Ketoglutarate–Dehydrogenase Complex: A Mediator Between Mitochondria and Oxidative Stress in Neurodegeneration. *Molecular Neurobiology*, 31(1–3), 043–064. <https://doi.org/10.1385/MN:31:1-3:043>
- González-Domínguez, R., García-Barrera, T., Vitorica, J., & Gómez-Ariza, J. L. (2015). Metabolomic screening of regional brain alterations in the APP/PS1 transgenic model of Alzheimer's disease by direct infusion mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 102, 425–435. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2014.10.009>
- González Zarzar, T., Lee, B., Coughlin, R., Kim, D., Shen, L., & Hall, M. A. (2022). Sex Differences in the Metabolome of Alzheimer's Disease Progression. *Frontiers in Radiology*, 2, 782864. <https://doi.org/10.3389/fradi.2022.782864>
- Han, X., & Gross, R. W. (2003). Global analyses of cellular lipidomes directly from crude extracts of biological samples by ESI mass spectrometry: A bridge to lipidomics. *Journal of Lipid Research*, 44(6), 1071–1079. <https://doi.org/10.1194/jlr.R300004-JLR200>
- Hansson Petersen, C. A., Alikhani, N., Behbahani, H., Wiehager, B., Pavlov, P. F., Alafuzoff, I., Leinonen, V., Ito, A., Winblad, B., Glaser, E., & Ankarcróna, M. (2008). The amyloid β -peptide is imported into mitochondria via the TOM import machinery and localized to mitochondrial cristae. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(35), 13145–13150. <https://doi.org/10.1073/pnas.0806192105>
- Hardy JA, Higgins GA. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science*. 1992 Apr 10;256(5054):184-5. Doi: 10.1126/science.1566067. PMID: 1566067.
- He, X., Huang, Y., Li, B., Gong, C.-X., & Schuchman, E. H. (2010). Deregulation of sphingolipid metabolism in Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, 31(3), 398–408. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2008.05.010>
- Heneka, M. T., Carson, M. J., Khoury, J. E., Landreth, G. E., Brosseron, F., Feinstein, D. L., Jacobs, A. H., Wyss-Coray, T., Vitorica, J., Ransohoff, R. M., Herrup, K., Frautschy, S. A., Finsen, B., Brown, G. C., Verkhatsky, A., Yamanaka, K., Koistinaho, J., Latz, E., Halle, A., ... Kummer, M. P. (2015). Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *The Lancet Neurology*, 14(4), 388–405. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(15\)70016-5](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(15)70016-5)
- Herndon, J. M., Tome, M. E., & Davis, T. P. (2017). Development and Maintenance of the Blood–Brain Barrier. V *Primer on Cerebrovascular Diseases* (s. 51–56). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803058-5.00009-6>
- Hesgrave, A., Heywood, W., Paterson, R., Magdalino, N., Svensson, J., Johansson, P., Öhrfelt, A., Blennow, K., Hardy, J., Schott, J., Mills, K., & Zetterberg, H. (2016). Increased cerebrospinal fluid soluble TREM2 concentration in Alzheimer's disease. *Molecular Neurodegeneration*, 11(1), 3. <https://doi.org/10.1186/s13024-016-0071-x>
- Holčápek, M., Liebisch, G., & Ekroos, K. (2018). Lipidomic Analysis. *Analytical Chemistry*, 90(7), 4249–4257. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b05395>

- Hsiao, J.-H. T., Fu, Y., Hill, A. F., Halliday, G. M., & Kim, W. S. (2013). Elevation in Sphingomyelin Synthase Activity Is Associated with Increases in Amyloid-Beta Peptide Generation. *PLoS ONE*, 8(8), e74016. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0074016>
- Human Metabolom Database*. <https://hmdb.ca/> (14.4.2023)
- Illingworth, D. R., & Glover, J. (1971). THE COMPOSITION OF LIPIDS IN CEREBROSPINAL FLUID OF CHILDREN AND ADULTS. *Journal of Neurochemistry*, 18(5), 769–776. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1971.tb12006.x>
- Irani, D. N. (2009). *Cerebrospinal fluid in clinical practice*. Saunders/Elsevier.
- Johanson, C. E., Stopa, E. G., & McMillan, P. N. (2011). The Blood–Cerebrospinal Fluid Barrier: Structure and Functional Significance. V S. Nag (Ed.), *The Blood-Brain and Other Neural Barriers* (Roč. 686, s. 101–131). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-938-3_4
- Johanson, C. E., Stopa, E. G., Daiello, L., Monte, S. de la, Keane, M., & Ott, B. R. (2018). Disrupted Blood-CSF Barrier to Urea and Creatinine in Mild Cognitive Impairment and Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease & Parkinsonism*, 08(02). <https://doi.org/10.4172/2161-0460.1000435>
- Kaddurah-Daouk, R., Zhu, H., Sharma, S., Bogdanov, M., Rozen, S. G., Matson, W., Oki, N. O., Motsinger-Reif, A. A., Churchill, E., Lei, Z., Appleby, D., Kling, M. A., Trojanowski, J. Q., Doraiswamy, P. M., Arnold, S. E., & Pharmacometabolomics Research Network. (2013). Alterations in metabolic pathways and networks in Alzheimer's disease. *Translational Psychiatry*, 3(4), e244–e244. <https://doi.org/10.1038/tp.2013.18>
- Kaiser, E., Schoenknecht, P., Kassner, S., Hildebrandt, W., Kinscherf, R., & Schroeder, J. (2010). Cerebrospinal Fluid Concentrations of Functionally Important Amino Acids and Metabolic Compounds in Patients with Mild Cognitive Impairment and Alzheimer's Disease. *Neurodegenerative Diseases*, 7(4), 251–259. <https://doi.org/10.1159/000287953>
- Karlíková, R., Mičová, K., Najdekr, L., Gardlo, A., Adam, T., Majerová, P., Friedecký, D., & Kováč, A. (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>
- Krumsiek, J., Mittelstrass, K., Do, K. T., Stückler, F., Ried, J., Adamski, J., Peters, A., Illig, T., Kronenberg, F., Friedrich, N., Nauck, M., Pietzner, M., Mook-Kanamori, D. O., Suhre, K., Gieger, C., Grallert, H., Theis, F. J., & Kastenmüller, G. (2015). Gender-specific pathway differences in the human serum metabolome. *Metabolomics*, 11(6), 1815–1833. <https://doi.org/10.1007/s11306-015-0829-0>
- Kashiwagi, A., Asahina, T., Ikebuchi, M., Tanaka, Y., Takagi, Y., Nishio, Y., Kikkawa, R., & Shigeta, Y. (n.d.). Abnormal glutathione metabolism and increased cytotoxicity caused by H2O2 in human umbilical vein endothelial cells cultured in high glucose medium.
- Katsel, P., Li, C., & Haroutunian, V. (2007). Gene Expression Alterations in the Sphingolipid Metabolism Pathways during Progression of Dementia and Alzheimer's Disease: A Shift Toward Ceramide Accumulation at the Earliest Recognizable Stages of Alzheimer's Disease? *Neurochemical Research*, 32(4–5), 845–856. <https://doi.org/10.1007/s11064-007-9297-x>
- Kmeťová, J., Skoršepa, M., & Vydrová, M. (2011). *Chémia pre 3. Ročník gymnázia so štvorročným štúdiom a 7. Ročník gymnázia s osemročným štúdiom*. Vydavateľstvo Matice slovenskej.
- Koal, T., Klavins, K., Seppi, D., Kemmler, G., & Humpel, C. (2015). Sphingomyelin SM(d18:1/18:0) is Significantly Enhanced in Cerebrospinal Fluid Samples Dichotomized by Pathological Amyloid-β42, Tau, and Phospho-Tau-181 Levels. *Journal of Alzheimer's Disease*, 44(4), 1193–1201. <https://doi.org/10.3233/JAD-142319>
- Koch, S., Donarski, N., Goetze, K., Kreckel, M., Stuerenburg, H.-J., Buhmann, C., & Beisiegel, U. (2001). Characterization of four lipoprotein classes in human cerebrospinal fluid. *Journal of Lipid Research*, 42(7), 1143–1151. [https://doi.org/10.1016/S0022-2275\(20\)31605-9](https://doi.org/10.1016/S0022-2275(20)31605-9)
- Koničková, D., Menšíková, K., Tučková, L., Hényková, E., Strnad, M., Friedecký, D., Stejskal, D., Matěj, R., & Kaňovský, P. (2022). Biomarkers of Neurodegenerative Diseases: Biology, Taxonomy, Clinical Relevance, and Current Research Status. *Biomedicines*, 10(7), 1760. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10071760>
- Kosicek, M., Kirsch, S., Bene, R., Trkanjec, Z., Titlic, M., Bindila, L., Peter-Katalinic, J., & Hecimovic, S. (2010). Nano-HPLC–MS analysis of phospholipids in cerebrospinal fluid of

- Alzheimer's disease patients—A pilot study. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 398(7–8), 2929–2937. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-4273-8>
- Kovacs, G. G. (2018). Tauopathies. V *Handbook of Clinical Neurology* (Roč. 145, s. 355–368). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802395-2.00025-0>
- Krumova K. & Cosa G. (2016), Chapter 1: Overview of Reactive Oxygen Species, in *Singlet Oxygen: Applications in Biosciences and Nanosciences*, Volume 1. pp. 1-21 DOI: 10.1039/9781782622208-00001
- Kusuhara, H., & Sugiyama, Y. (2004). Efflux transport systems for organic anions and cations at the blood-CSF barrier. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 56(12), 1741–1763. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2004.07.007>
- Laterra J, Keep R, Betz LA, et al. Blood—Cerebrospinal Fluid Barrier. In: Siegel GJ, Agranoff BW, Albers RW, et al., editors. *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects*. 6th edition. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1999. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27998/>
- Le Rhun, E., Taillibert, S., & Chamberlain, M. C. (2016). Neuroradiology of Leptomeningeal Metastases. V *Handbook of Neuro-Oncology Neuroimaging* (s. 705–721). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800945-1.00057-4>
- Lewczuk, P., Esselmann, H., Bibl, M., Beck, G., Maler, J. M., Otto, M., Kornhuber, J., & Wiltfang, J. (2004). Tau Protein Phosphorylated at Threonine 181 in CSF as a Neurochemical Biomarker in Alzheimer's Disease: Original Data and Review of the Literature. *Journal of Molecular Neuroscience*, 23(1–2), 115–122. <https://doi.org/10.1385/JMN:23:1-2:115>
- Li J., Doyle K.M., Tatlisumak T. (2007). Polyamines in the Brain: Distribution, Biological Interactions, and their Potential Therapeutic Role in Brain Ischaemia. *Current Medicinal Chemistry*, 14(17), 1807–1813. <https://doi.org/10.2174/092986707781058841>
- Li-Beisson, Y., Nakamura, Y., & Harwood, J. (2016). Lipids: From Chemical Structures, Biosynthesis, and Analyses to Industrial Applications. V Y. Nakamura & Y. Li-Beisson (Ed.), *Lipids in Plant and Algae Development* (Roč. 86, s. 1–18). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-25979-6_1
- Liddelow, S. A. (2015). Development of the choroid plexus and blood-CSF barrier. *Frontiers in Neuroscience*, 9. <https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00032>
- Liddelow, S. A., Guttenplan, K. A., Clarke, L. E., Bennett, F. C., Bohlen, C. J., Schirmer, L., Bennett, M. L., Münch, A. E., Chung, W.-S., Peterson, T. C., Wilton, D. K., Frouin, A., Napier, B. A., Panicker, N., Kumar, M., Buckwalter, M. S., Rowitch, D. H., Dawson, V. L., Dawson, T. M., ... Barres, B. A. (2017). Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature*, 541(7638), 481–487. <https://doi.org/10.1038/nature21029>
- Lim, S. C., Tajika, M., Shimura, M., Carey, K. T., Stroud, D. A., Murayama, K., Ohtake, A., & McKenzie, M. (2018). Loss of the Mitochondrial Fatty Acid β -Oxidation Protein Medium-Chain Acyl-Coenzyme A Dehydrogenase Disrupts Oxidative Phosphorylation Protein Complex Stability and Function. *Scientific Reports*, 8(1), 153. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18530-4>
- Lindon, J. C., Nicholson, J. K., & Holmes, E. (Ed.). (2007). *The handbook of metabonomics and metabolomics* (1st ed). Elsevier.
- LIPID MAPS*. <https://www.lipidmaps.org/> (citované 14.4.2023)
- Lombardo, S., & Maskos, U. (2015). Role of the nicotinic acetylcholine receptor in Alzheimer's disease pathology and treatment. *Neuropharmacology*, 96, 255–262. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2014.11.018>
- Mandal, R., Guo, A. C., Chaudhary, K. K., Liu, P., Yallou, F. S., Dong, E., Aziat, F., & Wishart, D. S. (2012). Multi-platform characterization of the human cerebrospinal fluid metabolome: A comprehensive and quantitative update. *Genome Medicine*, 4(4), 38. <https://doi.org/10.1186/gm337>
- Marton, L. J., Heby, O., & Wilson, C. B. (1974). A method for the determination of polyamines in cerebrospinal fluid. *FEBS Letters*, 46(1–2), 305–307. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(74\)80393-5](https://doi.org/10.1016/0014-5793(74)80393-5)

- Masters, C. L., Bateman, R., Blennow, K., Rowe, C. C., Sperling, R. A., & Cummings, J. L. (2015). Alzheimer's disease. *Nature Reviews Disease Primers*, 1(1), 15056. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.56>
- Mateos, L., Ismail, M.-A.-M., Gil-Bea, F.-J., Leoni, V., Winblad, B., Björkhem, I., & Cedazo-Minguez, A. (2011). Upregulation of Brain Renin Angiotensin System by 27-Hydroxycholesterol in Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 24(4), 669–679. <https://doi.org/10.3233/JAD-2011-101512>
- Maurer, I. (2000). A selective defect of cytochrome c oxidase is present in brain of Alzheimer disease patients. *Neurobiology of Aging*, 21(3), 455–462. [https://doi.org/10.1016/S0197-4580\(00\)00112-3](https://doi.org/10.1016/S0197-4580(00)00112-3)
- Mielke, M. M., Haughey, N. J., Bandaru, Veera. V. R., Zetterberg, H., Blennow, K., Andreasson, U., Johnson, S. C., Gleason, C. E., Blazek, H. M., Puglielli, L., Sager, M. A., Asthana, S., & Carlsson, C. M. (2014). Cerebrospinal fluid sphingolipids, β -amyloid, and tau in adults at risk for Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, 35(11), 2486–2494. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2014.05.019>
- Monterey, M. D., Wei, H., Wu, X., & Wu, J. Q. (2021). The Many Faces of Astrocytes in Alzheimer's Disease. *Frontiers in Neurology*, 12, 619626. <https://doi.org/10.3389/fneur.2021.619626>
- Moore, S. C., Matthews, C. E., Sampson, J. N., Stolzenberg-Solomon, R. Z., Zheng, W., Cai, Q., Tan, Y. T., Chow, W.-H., Ji, B.-T., Liu, D. K., Xiao, Q., Boca, S. M., Leitzmann, M. F., Yang, G., Xiang, Y. B., Sinha, R., Shu, X. O., & Cross, A. J. (2014). Human metabolic correlates of body mass index. *Metabolomics*, 10(2), 259–269. <https://doi.org/10.1007/s11306-013-0574-1>
- Morley, J. E., & Farr, S. A. (2014). The role of amyloid-beta in the regulation of memory. *Biochemical Pharmacology*, 88(4), 479–485. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2013.12.018>
- Morris, M. E., Rodriguez-Cruz, V., & Felmler, M. A. (2017). SLC and ABC Transporters: Expression, Localization, and Species Differences at the Blood-Brain and the Blood-Cerebrospinal Fluid Barriers. *The AAPS Journal*, 19(5), 1317–1331. <https://doi.org/10.1208/s12248-017-0110-8>
- Murphy, M. P., & LeVine, H. (2010). Alzheimer's Disease and the Amyloid- β Peptide. *Journal of Alzheimer's Disease*, 19(1), 311–323. <https://doi.org/10.3233/JAD-2010-1221>
- Nalbantoglu, S. (2019). *Metabolomics: Basic Principles and Strategies*. V S. Nalbantoglu & H. Amri (Ed.), *Molecular Medicine*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.88563>
- Oddo, S., & LaFerla, F. M. (2006). The role of nicotinic acetylcholine receptors in Alzheimer's disease. *Journal of Physiology-Paris*, 99(2–3), 172–179. <https://doi.org/10.1016/j.jphysparis.2005.12.080>
- Orešković, D., & Klarica, M. (2011). Development of hydrocephalus and classical hypothesis of cerebrospinal fluid hydrodynamics: Facts and illusions. *Progress in Neurobiology*, 94(3), 238–258. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2011.05.005>
- Ott, B. R., Jones, R. N., Daiello, L. A., de la Monte, S. M., Stopa, E. G., Johanson, C. E., Denby, C., & Grammas, P. (2018). Blood-Cerebrospinal Fluid Barrier Gradients in Mild Cognitive Impairment and Alzheimer's Disease: Relationship to Inflammatory Cytokines and Chemokines. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 10, 245. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2018.00245>
- Papassotiropoulos, A., Lütjohann, D., Bagli, M., Locatelli, S., Jessen, F., Buschfort, R., Ptak, U., Björkhem, I., von Bergmann, K., & Heun, R. (2002). 24S-hydroxycholesterol in cerebrospinal fluid is elevated in early stages of dementia. *Journal of Psychiatric Research*, 36(1), 27–32. [https://doi.org/10.1016/S0022-3956\(01\)00050-4](https://doi.org/10.1016/S0022-3956(01)00050-4)
- Parker, W. D., & Parks, J. K. (1995). Cytochrome C Oxidase in Alzheimer's Disease Brain: Purification and Characterization. *Neurology*, 45(3), 482–486. <https://doi.org/10.1212/WNL.45.3.482>
- Patel, N., & Kirmi, O. (2009). Anatomy and Imaging of the Normal Meninges. *Seminars in Ultrasound, CT and MRI*, 30(6), 559–564. <https://doi.org/10.1053/j.sult.2009.08.006>
- Pernecky, R. (Ed.). (2018). *Biomarkers for preclinical Alzheimer's disease*. Humana Press.

- Pettit, D. L., Shao, Z., & Yakel, J. L. (2001). β -Amyloid 1–42 Peptide Directly Modulates Nicotinic Receptors in the Rat Hippocampal Slice. *The Journal of Neuroscience*, 21(1), RC120–RC120. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-01-j0003.2001>
- Picklo, M. J., Olson, S. J., Markesbery, W. R., & Montine, T. J. (2001). Expression and Activities of Aldo-Keto Oxidoreductases in Alzheimer Disease. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 60(7), 686–695. <https://doi.org/10.1093/jnen/60.7.686>
- Pierson, A. D., Mohamad, M., Rajab, F., & Suppiah, S. (2021). Cerebrospinal Fluid Amyloid Beta, Tau Levels, Apolipoprotein, and 1H-MRS Brain Metabolites in Alzheimer’s Disease: A Systematic Review. *Academic Radiology*, 28(10), 1447–1463. <https://doi.org/10.1016/j.acra.2020.06.006>
- Plourde, M. (2021). Lipid Transport and Metabolism at the Blood-Brain Interface: Implications in Health and Disease. *Frontiers in Physiology*, 12. DOI: 10.3389/fphys.2021.645646
- Podcasy, J. L., & Epperson, C. N. (2016). Considering sex and gender in Alzheimer disease and other dementias. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 18(4), 437–446. <https://doi.org/10.31887/DCNS.2016.18.4/cepperson>
- Praetorius, J., & Damkier, H. H. (2017). Transport across the choroid plexus epithelium. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 312(6), C673–C686. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00041.2017>
- Puzzo, D., Privitera, L., Leznik, E., Fa, M., Staniszewski, A., Palmeri, A., & Arancio, O. (2008). Picomolar Amyloid- Positively Modulates Synaptic Plasticity and Memory in Hippocampus. *Journal of Neuroscience*, 28(53), 14537–14545. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2692-08.2008>
- Qian, L., Chai, A. B., Gelissen, I. C., & Brown, A. J. (2022). Balancing cholesterol in the brain: From synthesis to disposal. *Exploration of Neuroprotective Therapy*, 1–27. <https://doi.org/10.37349/ent.2022.00015>
- Qu, Q., Zeng, F., Liu, X., Wang, Q. J., & Deng, F. (2016). Fatty acid oxidation and carnitine palmitoyltransferase I: Emerging therapeutic targets in cancer. *Cell Death & Disease*, 7(5), e2226–e2226. <https://doi.org/10.1038/cddis.2016.132>
- Raha-Chowdhury, R., Henderson, J. W., Raha, A. A., Vuono, R., Bickerton, A., Jones, E., Fincham, R., Allinson, K., Holland, A., & Zaman, S. H. (2019). Choroid Plexus Acts as Gatekeeper for TREM2, Abnormal Accumulation of ApoE, and Fibrillary Tau in Alzheimer’s Disease and in Down Syndrome Dementia. *Journal of Alzheimer’s Disease*, 69(1), 91–109. <https://doi.org/10.3233/JAD-181179>
- Rand, J.B (2007). Acetylcholine. *WormBook*, ed. The C. elegans Research Community, *WormBook*, doi/10.1895/wormbook.
- Rao, V. V., Dahlheimer, J. L., Bardgett, M. E., Snyder, A. Z., Finch, R. A., Sartorelli, A. C., & Piwnicka-Worms, D. (1999). Choroid plexus epithelial expression of MDR 1 P glycoprotein and multidrug resistance-associated protein contribute to the blood–cerebrospinal-fluid drug-permeability barrier. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(7), 3900–3905. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.7.3900>
- Redzic, Z. (2011). Molecular biology of the blood-brain and the blood-cerebrospinal fluid barriers: Similarities and differences. *Fluids and Barriers of the CNS*, 8(1), 3. <https://doi.org/10.1186/2045-8118-8-3>
- Reiber, H. (2001). Dynamics of brain-derived proteins in cerebrospinal fluid. *Clinica Chimica Acta*, 310(2), 173–186. [https://doi.org/10.1016/S0009-8981\(01\)00573-3](https://doi.org/10.1016/S0009-8981(01)00573-3)
- Richter, J. A., Perry, E. K., & Tomlinson, B. E. (1980). Acetylcholine and choline levels in post-mortem human brain tissue: Preliminary observations in Alzheimer’s disease. *Life Sciences*, 26(20), 1683–1689. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(80\)90176-9](https://doi.org/10.1016/0024-3205(80)90176-9)
- Rusina, R., Matěj, R., Růžička, E., & Roth, J. (2015). Differential Diagnosis of Tauopathies – a Clinical Approach. *Česká a slovenská neurologie a neurochirurgie*, 78/111(5), 526–534. <https://doi.org/10.14735/amcsnn2015526>
- Roberts, L. D., Souza, A. L., Gerszten, R. E., & Clish, C. B. (2012). Targeted Metabolomics. *Current Protocols in Molecular Biology*, 98(1). <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb3002s98>

- Sakka, L., Coll, G., & Chazal, J. (2011). Anatomy and physiology of cerebrospinal fluid. *European Annals of Otorhinolaryngology, Head and Neck Diseases*, 128(6), 309–316. <https://doi.org/10.1016/j.anorl.2011.03.002>
- Saunders, N. R., Daneman, R., Dziegielewska, K. M., & Liddel, S. A. (2013). Transporters of the blood–brain and blood–CSF interfaces in development and in the adult. *Molecular Aspects of Medicine*, 34(2–3), 742–752. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2012.11.006>
- Seehusen DA, Reeves MM, Fomin DA. Cerebrospinal fluid analysis. *Am Fam Physician*. 2003 Sep 15;68(6):1103-8. PMID: 14524396.
- Shi, L., & Tu, B. P. (2015). Acetyl-CoA and the regulation of metabolism: Mechanisms and consequences. *Current Opinion in Cell Biology*, 33, 125–131. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2015.02.003>
- Schneider, N., Hauser, J., Oliveira, M., Cazaubon, E., Mottaz, S. C., O’Neill, B. V., Steiner, P., & Deoni, S. C. L. (2019). Sphingomyelin in Brain and Cognitive Development: Preliminary Data. *Eneuro*, 6(4), ENEURO.0421-18.2019. <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0421-18.2019>
- Sims, N. R., Bowen, D. M., Allen, S. J., Smith, C. C. T., Neary, D., Thomas, D. J., & Davison, A. N. (1983). Presynaptic Cholinergic Dysfunction in Patients with Dementia. *Journal of Neurochemistry*, 40(2), 503–509. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1983.tb11311.x>
- Sims, N. R., Anderson, M. F., Hobbs, L. M., Kong, J. Y., Phillips, S., Powell, J. A., & Zaidan, E. (2000). Impairment of brain mitochondrial function by hydrogen peroxide. *Molecular Brain Research*, 77(2), 176–184. [https://doi.org/10.1016/S0169-328X\(00\)00049-8](https://doi.org/10.1016/S0169-328X(00)00049-8)
- Smith, C. D., Carney, J. M., Starke-Reed, P. E., Oliver, C. N., Stadtman, E. R., Floyd, R. A., & Markesbery, W. R. (1991). Excess brain protein oxidation and enzyme dysfunction in normal aging and in Alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(23), 10540–10543. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.23.10540>
- Solár, P., Zamani, A., Kubíčková, L., Dubový, P., & Joukal, M. (2020). Choroid plexus and the blood–cerebrospinal fluid barrier in disease. *Fluids and Barriers of the CNS*, 17(1), 35. <https://doi.org/10.1186/s12987-020-00196-2>
- SLC Tables*. <http://slc.bioparadigms.org/> (15.12.2022)
- Spector, R., & Johanson, C. E. (1989). The Mammalian Choroid Plexus. *Scientific American*, 261(5), 68–74. <https://doi.org/10.1038/scientificamerican1189-68>
- Spector R, Robert Snodgrass S, Johanson CE (2015). A balanced view of the cerebrospinal fluid composition and functions: Focus on adult humans. *Exp Neurol*.273:57-68. Doi: 10.1016/j.expneurol.2015.07.027.
- Spillantini, M. G., & Goedert, M. (2013). Tau pathology and neurodegeneration. *The Lancet Neurology*, 12(6), 609–622. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(13\)70090-5](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(13)70090-5)
- Stachowiak, O., Dolder, M., Wallimann, T., & Richter, C. (1998). Mitochondrial Creatine Kinase Is a Prime Target of Peroxynitrite-induced Modification and Inactivation. *Journal of Biological Chemistry*, 273(27), 16694–16699. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.27.16694>
- Stoop, M. P., Coulier, L., Rosenling, T., Shi, S., Smolinska, A. M., Buydens, L., Ampt, K., Stingl, C., Dane, A., Muilwijk, B., Luitwieler, R. L., Smitt, P. A. E. S., Hintzen, R. Q., Bischoff, R., Wijmenga, S. S., Hankemeier, T., Gool, A. J. van, & Luijck, T. M. (2010). Quantitative Proteomics and Metabolomics Analysis of Normal Human Cerebrospinal Fluid Samples*. *Molecular & Cellular Proteomics*, 9(9), 2063–2075. <https://doi.org/10.1074/mcp.M110.000877>
- Swerdlow, R. H., & Khan, S. M. (2004). A “mitochondrial cascade hypothesis” for sporadic Alzheimer’s disease. *Medical Hypotheses*, 63(1), 8–20. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2003.12.045>
- Suárez-Calvet, M., Araque Caballero, M. Á., Kleinberger, G., Bateman, R. J., Fagan, A. M., Morris, J. C., Levin, J., Danek, A., Ewers, M., Haass, C., & for the Dominantly Inherited Alzheimer Network. (2016). Early changes in CSF sTREM2 in dominantly inherited Alzheimer’s disease occur after amyloid deposition and neuronal injury. *Science Translational Medicine*, 8(369). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aag1767>
- Sussulini, A. (Ed.). (2017). *Metabolomics: From Fundamentals to Clinical Applications* (Roč. 965). Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-47656-8>

- Šišková, K. (2015). Volné radikály a oxidačný stres. Lékařská fakulta v Plzni Univerzity Karlovy.
- Takuma, K., Fang, F., Zhang, W., Yan, S., Fukuzaki, E., Du, H., Sosunov, A., McKhann, G., Funatsu, Y., Nakamichi, N., Nagai, T., Mizoguchi, H., Ibi, D., Hori, O., Ogawa, S., Stern, D. M., Yamada, K., & Yan, S. S. (2009). RAGE-mediated signaling contributes to intraneuronal transport of amyloid- β and neuronal dysfunction. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(47), 20021–20026. <https://doi.org/10.1073/pnas.0905686106>
- Tabatabaie, T., Potts, J. D., & Floyd, R. A. (1996). Reactive Oxygen Species-Mediated Inactivation of Pyruvate Dehydrogenase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 336(2), 290–296. <https://doi.org/10.1006/abbi.1996.0560>
- Thal, D. R., Rüb, U., Orantes, M., & Braak, H. (n.d.). Phases of A β -deposition in the human brain and its relevance for the development of AD. DOI: 10.1212/wnl.58.12.1791
- Thomas, N. J., Shields, B. M., Besser, R. E. J., Jones, A. G., Rawlingson, A., Goodchild, E., Leighton, C., Bowman, P., Shepherd, M., Knight, B. A., McDonald, T. J., & Hattersley, A. T. (2012). The impact of gender on urine C-peptide creatinine ratio interpretation. *Annals of Clinical Biochemistry: International Journal of Laboratory Medicine*, 49(4), 363–368. <https://doi.org/10.1258/acb.2011.011164>
- Tumani, H., Huss, A., & Bachhuber, F. (2018). The cerebrospinal fluid and barriers – anatomic and physiologic considerations. V *Handbook of Clinical Neurology* (Roč. 146, s. 21–32). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804279-3.00002-2>
- Tuppo, E. E., & Arias, H. R. (2005). The role of inflammation in Alzheimer's disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 37(2), 289–305. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2004.07.009>
- Tzeng, C.-Y., Lee, W.-S., Liu, K.-F., Tsou, H.-K., Chen, C.-J., Peng, W.-H., & Tsai, J.-C. (2022). Allantoin ameliorates amyloid β -peptide-induced memory impairment by regulating the PI3K/Akt/GSK-3 β signaling pathway in rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 153, 113389. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.113389>
- Van der Velpen, V., Teav, T., Gallart-Ayala, H., Mehl, F., Konz, I., Clark, C., Oikonomidi, A., Peyratout, G., Henry, H., Delorenzi, M., Ivanisevic, J., & Popp, J. (2019). Systemic and central nervous system metabolic alterations in Alzheimer's disease. *Alzheimer's Research & Therapy*, 11(1), 93. <https://doi.org/10.1186/s13195-019-0551-7>
- Van Oostveen, W. M., & De Lange, E. C. M. (2021). Imaging Techniques in Alzheimer's Disease: A Review of Applications in Early Diagnosis and Longitudinal Monitoring. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(4), 2110. <https://doi.org/10.3390/ijms22042110>
- Verkhratsky, A., & Parpura, V. (2016). Astroglipathology in neurological, neurodevelopmental and psychiatric disorders. *Neurobiology of Disease*, 85, 254–261. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2015.03.025>
- Villas-Bôas, S. G. (Ed.). (2007). *Metabolome analysis: An introduction*. Wiley-Interscience.
- Voevodskaya O, Sundgren PC, Strandberg O, Zetterberg H, Minthon L, Blennow K, Wahlund LO, Westman E, Hansson O; Swedish BioFINDER study group. Myo-inositol changes precede amyloid pathology and relate to APOE genotype in Alzheimer disease. *Neurology*. 2016 May 10;86(19):1754-61. Doi: 10.1212/WNL.0000000000002672.
- Wang, H.-Y., Lee, D. H. S., D'Andrea, M. R., Peterson, P. A., Shank, R. P., & Reitz, A. B. (2000). β -Amyloid_{1–42} Binds to α 7 Nicotinic Acetylcholine Receptor with High Affinity. *Journal of Biological Chemistry*, 275(8), 5626–5632. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.8.5626>
- Walton, H., & Dodd, P. (2007). Glutamate–glutamine cycling in Alzheimer's disease. *Neurochemistry International*, 50(7–8), 1052–1066. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2006.10.007>
- Wester, P., Bergström, U., Eriksson, A., Gezelius, C., Hardy, J., & Winblad, B. (1990). Ventricular Cerebrospinal Fluid Monoamine Transmitter and Metabolite Concentrations Reflect Human Brain Neurochemistry in Autopsy Cases. *Journal of Neurochemistry*, 54(4), 1148–1156. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1990.tb01942.x>

- Whitson, J., Selkoe, D., & Cotman, C. (1989). Amyloid beta protein enhances the survival of hippocampal neurons in vitro. *Science*, 243(4897), 1488–1490. doi:10.1126/science.2928783
- Uddin, Md. S., Kabir, Md. T., Rahman, Md. S., Behl, T., Jeandet, P., Ashraf, G. M., Najda, A., Bin-Jumah, M. N., El-Seedi, H. R., & Abdel-Daim, M. M. (2020). Revisiting the Amyloid Cascade Hypothesis: From Anti-A β Therapeutics to Auspicious New Ways for Alzheimer's Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(16), 5858. <https://doi.org/10.3390/ijms21165858>
- Xu, J., Green, R., Kim, M., Lord, J., Ebshiana, A., Westwood, S., Baird, A. L., Nevado-Holgado, A. J., Shi, L., Hye, A., Snowden, S. G., Bos, I., Vos, S. J. B., Vandenberghe, R., Teunissen, C. E., Kate, M. T., Scheltens, P., Gabel, S., Meersmans, K., ... on behalf of the European Medical Information Framework Consortium. (2021). Sex-Specific Metabolic Pathways Were Associated with Alzheimer's Disease (AD) Endophenotypes in the European Medical Information Framework for AD Multimodal Biomarker Discovery Cohort. *Biomedicines*, 9(11), 1610. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9111610>
- Yatin, S. M., Yatin, M., Aulick, T., Ain, K. B., & Butterfield, D. A. (1999). Alzheimer's amyloid b-peptide associated free radicals increase rat embryonic neuronal polyamine uptake and ornithine decarboxylase activity: Protective effect of vitamin E. *Neuroscience Letters*.
- Yatin, S. M., Yatin, M., Varadarajan, S., Ain, K. B., & Butterfield, D. A. (2001). Role of spermine in amyloid β -peptide-associated free radical-induced neurotoxicity. *Journal of Neuroscience Research*, 63(5), 395–401. [https://doi.org/10.1002/1097-4547\(20010301\)63:5<395::AID-JNR1034>3.0.CO;2-Q](https://doi.org/10.1002/1097-4547(20010301)63:5<395::AID-JNR1034>3.0.CO;2-Q)
- Yoshiyama, Y., Higuchi, M., Zhang, B., Huang, S.-M., Iwata, N., Saido, T. C., Maeda, J., Suhara, T., Trojanowski, J. Q., & Lee, V. M.-Y. (2007). Synapse Loss and Microglial Activation Precede Tangles in a P301S Tauopathy Mouse Model. *Neuron*, 53(3), 337–351. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.01.010>
- Yu, Z., Zhai, G., Singmann, P., He, Y., Xu, T., Prehn, C., Römisch-Margl, W., Lattka, E., Gieger, C., Soranzo, N., Heinrich, J., Standl, M., Thiering, E., Mittelstraß, K., Wichmann, H., Peters, A., Suhre, K., Li, Y., Adamski, J., ... Wang-Sattler, R. (2012). Human serum metabolic profiles are age dependent. *Aging Cell*, 11(6), 960–967. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2012.00865.x>

8 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK

ABC	– transportéry ATP-viažúce kazetu
A β	– β -amyloid
AC	– acylkarnitín
Acetyl-CoA	– acetyl koenzým A
ACN	– acetonitril
AD	– Alzheimerova choroba
AD.muž	– muž s Alzheimerovou chorobou
AD.žena	– žena s Alzheimerovou chorobou
Ach	– acetylcholín
AICD	– intracelulárna doména amyloidného prekursorového proteínu
AK	– aminokyselina
AM	– amín
AOX	– antioxidant
APOE4	– apolipoproteín E4
APP	– amyloidný prekursorový proteín
α CTF89	– C-terminálny fragment s 83 aminokyselinami
α KGDH	– α -ketoglutarátdehydrogenasa
BCTF99	– C terminálny fragment s 99 aminokyselinami
CACT	– karnitín-acylkarnitín transferasa
CE	– cholesterol ester
Cer	– ceramid
CN	– kontrola
CN.muž	– mužská kontrolná vzorka
CN.žena	– ženská kontrolná vzorka
CNS	– centrálna nervová sústava
Co	– koenzým
CPTI	– karnitín palmitoyltransferasa I
CPTII	– karnitín palmitoyltransferasa II
CSF	– mozgovomiešny mok
CV	– variačný koeficient
dAk	– derivát aminokyseliny

ESI	– ionizácia elektrosprejom
eNOS	– endoteliálna syntasa oxidu dusnatého
GPL	– glycerolfosfolipid
HexCer	– hexozylceramid
HILIC	– hydrofilná interakčná chromatografia
IDH	– izocitrátdehydrogenasa
iNOS	– indukibilná syntasa oxidu dusnatého
IPA	– izopropanol
LACS	– acylkoenzým A syntetasa
LC	– kvapalinová chromatografia
LC-MS/MS	– kvapalinová chromatografia s tandemovým hmotnostným spektrometrom
LOESS	– lokálne vážená regresia
LPC	– lyzofosfatidylcholín
LPE	– lyzofosfatidyletanolamín
mAChR	– muskarínový receptor acetylcholínu
MeOH	– metanol
MDH	– malátdehydrogenasa
MHC II	– hlavný histokompatibilný komplex II
MCI	– mierna kognitívna porucha
MRM	– monitorovanie viacerých reakcií
MRP	– proteíny multidrogovej rezistencie
MS	– hmotnostná spektrometria
<i>m/z</i>	– pomer hmotnosti a náboja
nAChR	– nikotínový receptor acetylcholínu
NO	– oxid dusnatý
NOS	– syntasa oxidu dusnatého
nNOS	– neurónova syntasa oxidu dusnatého
OK	– organická kyselina
PC	– fosfatidylcholín
PCA	– analýza hlavných komponent
PC (O-/P-)	– fosfatidylcholín s akyl/alkenyl éterovým substituentom

PE	– fosfatidyletanolamín
PE (O-/P-)	– fosfatidyletanolamíny s alkyl/akenyl éterovým substituentom
PLS-DA	– diskriminačná analýza najmenších štvorcov
PDH	– pyruvátdehydrogenasa
Pgp	– transportéry P-glykoproteínu
p-tau	– fosforylovaná forma Tau proteínu
Pur	– purín
Pyr	– pyrimidín
QC	– vzorka kontroly kvality
Q1	– pomer hmotnosti a náboja molekulového iónu
Q3	– pomer hmotnosti a náboja preoduktového iónu
RNS	– reaktívne formy dusíka
ROS	– reaktívne formy kyslíka
Sach	– sacharid
sAPP	– rozpustný peptid amyloidného prekursorového proteínu
SDH	– sukcinátdehydrogenasa
SLC	– transportéry nosičov rozpustených látok
SM	– sfingomyelín
SNAP25	– synatozomálny asociovaný proteín
SP	– sfingolipid
SPARC	– albumín viažuci transportér
sTREM 2	– rozpustný spúšťací receptor exprimovaný na myeloidných bunkách 2
t-tau	– celkový Tau proteín
VILIP-1	– visinínu podobným proteínom 1

9 ZOZNAM PRÍLOH

Príloha 1 – Klinické informácie o skúmaných subjektoch