

SVEUČILIŠTE U RIJECI
FAKULTET BIOTEHNOLOGIJE I RAZVOJA LIJEKOVA

Tina Ćurković

**METABOLOMSKI PRISTUP U ISTRAŽIVANJU
ALZHEIMEROVE BOLESTI: U POTRAZI ZA
POTENCIJALNIM BIOMARKERIMA
NEURODEGENERACIJE**

DOKTORSKI RAD

Rijeka, 2026.

SVEUČILIŠTE U RIJECI
FAKULTET BIOTEHNOLOGIJE I RAZVOJA LIJEKOVA

Tina Ćurković

**METABOLOMSKI PRISTUP U ISTRAŽIVANJU
ALZHEIMEROVE BOLESTI: U POTRAZI ZA
POTENCIJALNIM BIOMARKERIMA
NEURODEGENERACIJE**

DOKTORSKI RAD

Mentor: dr. sc. Matea Nikolac Perković

Rijeka, 2026.

UNIVERSITY OF RIJEKA
FACULTY OF BIOTECHNOLOGY AND DRUG DEVELOPMENT

Tina Ćurković

**METABOLOMIC APPROACH IN ALZHEIMER'S
DISEASE: SEARCHING FOR POTENTIAL
BIOMARKERS OF NEURODEGENERATION**

DOCTORAL THESIS

Rijeka, 2026.

Mentor: dr. sc. Matea Nikolac Perković

Doktorski rad obranjen je dana _____2026. Godine na Fakultetu
biotehnologije i razvoja lijekova Sveučilišta u Rijeci pred povjerenstvom u sastavu:

- 1.
- 2.
- 3.

ZAHVALE

SAŽETAK

Alzheimerova bolest (AB) je složena, progresivna i neizlječiva neurodegenerativna bolest koju karakterizira gubitak pamćenja i pad kognitivnih funkcija. S obzirom na ograničene terapijske mogućnosti i potrebu za ranijim postavljanjem dijagnoze, metabolomika predstavlja snažan alat za identifikaciju metaboličkih promjena povezanih s patogeneom AB-a te za otkrivanje potencijalnih biomarkera. Cilj ovog doktorskog rada je istražiti biokemijske promjene povezane s AB-om primjenom neciljane metabolomske analize ljudskih uzoraka plazme te plazme i prefrontalnog korteksa mišjeg modela AB-a, 3xTg-AD. Dodatni cilj istraživanja je i ispitati učinak dehidroepiandrosteron sulfata (DHEAS), čija bi nadoknada mogla imati povoljan učinak na kognitivne funkcije u AB-u, na metaboličke puteve u miševa 3xTg-AD. Neurosteroid DHEAS uključen je u brojne biološke procese, uključujući regulaciju sinaptičke plastičnosti, oksidativni stres i neuroupalu, a promjene u njegovoj razini prisutne su u različitim neuropsihijatrijskim bolestima, uključujući i AB. Rezultati ovog istraživanja pokazali su prisutnost metaboličkih promjena kod ispitanika blagim neurokognitivnim poremećajem (MCI) i ispitanika s AB-om u odnosu na zdrave kontrole, osobito u metabolitima uključenima u energetske metabolizam te metabolizam aminokiselina i lipida. Slični metabolički obrasci uočeni su i kod miševa 3xTg-AD, a terapija neurosteroidom DHEAS djelomično je pokazala modulacijske i blago neuroprotektivne učinke na promijenjene metaboličke procese. Zaključno, ovo istraživanje potvrđuje značaj metabolomskog pristupa u istraživanju patofizioloških i biokemijskih promjena u AB-u te upućuje na potencijal lijeka DHEAS kao modulatora metaboličkih procesa.

SUMMARY

Alzheimer's disease (AD) is a complex, progressive, and incurable neurodegenerative disease characterized by memory loss and cognitive decline. Given the limited therapeutic options and the need for earlier diagnosis, metabolomics represents a powerful tool for identifying metabolic changes associated with the pathogenesis of AD and for discovering potential biomarkers. This doctoral thesis aims to investigate biochemical changes associated with AD using untargeted metabolomic analysis of human plasma samples, and plasma and prefrontal cortex of a mouse model of AD, 3xTg-AD. An additional aim of the study was to examine the effect of dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS), which, when supplemented, might have a beneficial effect on cognitive function in AD, on metabolic pathways in 3xTg-AD mice. Neurosteroid DHEAS is involved in numerous biological processes, including the regulation of synaptic plasticity, oxidative stress, and neuroinflammation, while changes in its level are present in various neuropsychiatric disorders, including AD. The results of this study showed that metabolic changes are present in subjects with mild neurocognitive impairment (MCI), and AD subjects compared to healthy controls, especially in metabolites involved in energy metabolism, amino acid, and lipid metabolism. Similar metabolic patterns were observed in 3xTg-AD mice, and the treatment with neurosteroid DHEAS showed a partial modulatory and neuroprotective effect in these altered metabolic processes. In conclusion, this study confirms the importance of a metabolic approach in investigating pathophysiological and biochemical changes in AD and indicates the potential of DHEAS as a modulator of metabolic processes.

Sadržaj

1.	UVOD.....	1
1.1.	Alzheimerova bolest (AB)	1
1.1.1.	Neuropatološka obilježja AB-a	1
1.1.2.	Tijek bolesti i klinička obilježja AB-a	4
1.1.3.	Čimbenici rizika AB-a.....	6
1.1.4.	Hipoteze nastanka AB-a	7
1.1.5.	Neuroupala i oksidativni stres u AB-u.....	9
1.1.6.	Metaboličke promjene u AB-u.....	11
1.1.7.	Animalni modeli u istraživanjima AB-a	12
1.1.8.	Terapijski pristup i izazovi u liječenju AB-a.....	13
1.2.	Dehidroepiandrosteron i njegov sulfat (DHEAS).....	14
1.2.1.	DHEA(S) u AB-u	16
1.3.	Metabolomika.....	17
1.3.1.	Dizajn metabolomskih studija	19
1.3.2.	Tijek metabolomskih istraživanja	20
1.3.3.	Analitičke platforme i tehnike u metabolomici	22
1.3.4.	Primjena metabolomike u biomedicinskim istraživanjima	34
2.	HIPOTEZA I CILJEVI	37
3.	MATERIJALI I METODE.....	39
3.1.	Ljudski ispitanici	39
3.1.1.	Obrada uzoraka krvi.....	40
3.2.	Životinjski model AB-a <i>in vivo</i>	40
3.2.1.	Tretman lijekom DHEAS-om	41
3.2.2.	Testovi ponašanja	42
3.2.3.	Izolacija plazme iz krvi miševa	45
3.2.4.	Izolacija prefrontalnog korteksa i hipokampusa iz mozga miševa.....	45
3.2.5.	Imunohistokemija	46
3.3.	Metabolomske analize	47
3.3.1.	Priprema uzoraka za analizu metodom LC-MS.....	47
3.3.2.	Priprema uzoraka za analizu metodom GC-MS.....	48
3.3.3.	Priprema negativnih kontrola (slijepih proba) i uzoraka kontrole kvalitete	50

3.3.4.	Postavke analitičkih metoda.....	50
3.3.5.	Obrada podataka	52
4.	REZULTATI.....	56
3.4.	Ljudski ispitanici	56
3.4.1.	Demografski podaci	56
3.4.2.	Metabolomsko profiliranje metodom LC-MS.....	58
3.4.3.	Metabolomsko profiliranje metodom GC-MS.....	63
3.5.	Animalni model	67
3.5.1.	Potvrda animalnog modela AB-a	67
3.5.2.	Metabolomsko profiliranje uzoraka plazme metodom LC-MS.....	72
3.5.3.	Metabolomsko profiliranje uzoraka plazme metodom GC-MS.....	78
3.5.4.	Metabolomsko profiliranje uzoraka tkiva metodom LC-MS	81
3.5.5.	Metabolomsko profiliranje uzoraka tkiva metodom GC-MS	86
5.	RASPRAVA.....	89
5.1.	Promjene u metabolizmu aminokiselina i energije u AB-u.....	90
5.2.	Promjene u metabolizmu lipida u AB-u.....	96
5.2.1.	Masne kiseline i glicerolipidi.....	96
5.2.2.	Glicerofosfolipidi.....	100
5.3.	Ostale promjene u AB-u	104
5.4.	Usporedba metaboličkih profila ljudi i mišjeg modela AB-a.....	105
5.5.	Učinak tretmana DHEAS na promijenjene metaboličke puteve	107
5.6.	Ograničenja istraživanja	110
6.	ZAKLJUČAK.....	111
7.	LITERATURA	114
	POPIS KRATICA.....	154
	POPIS SLIKA	158
	POPIS TABLICA	164
	ŽIVOTOPIS.....	165

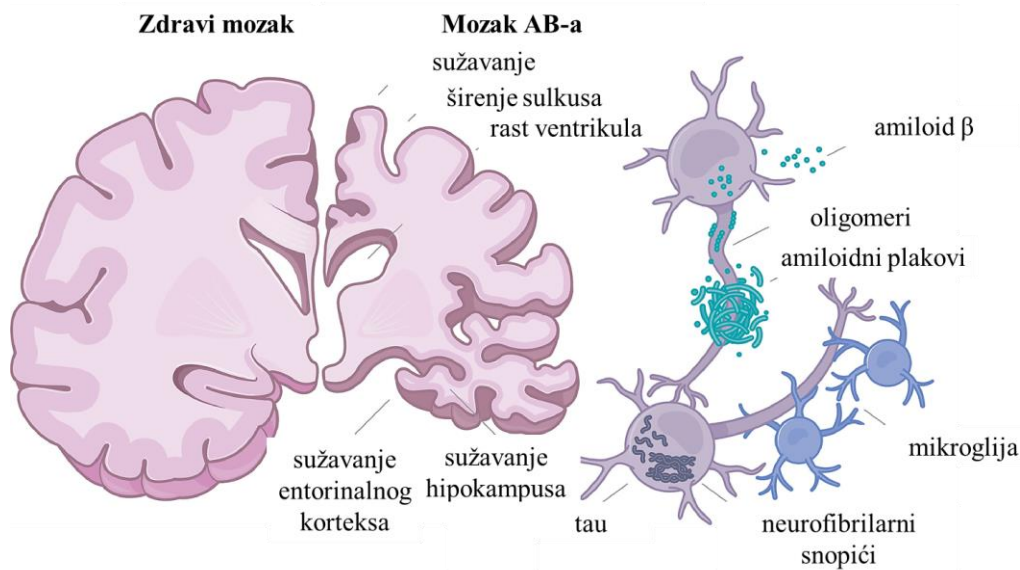
1. UVOD

1.1. Alzheimerova bolest (AB)

Demencija je opći pojam koji obuhvaća skupinu bolesti i stanja koja utječu na pamćenje, razmišljanje, rasuđivanje, osobnost, ponašanje i raspoloženje. Demencija je vodeći zdravstveni problem jer trenutno od nje boluje oko 55 milijuna ljudi, a procjenjuje se da će se taj broj povećati na 139 milijuna do 2050. godine (2). Alzheimerova bolest (AB) je najčešći uzrok demencije i čini 60-70% svih slučajeva. Ostali česti uzorci demencije uključuju Parkinsonovu bolest, vaskularnu demenciju, frontotemporalnu demenciju i demenciju s Lewijevim tjelešcima (3). AB je kompleksna i progresivna neurodegenerativna bolest koju karakterizira gubitak pamćenja i pad kognitivnih sposobnosti, uključujući promjene u ponašanju, govoru, rasuđivanju te vizualno-prostornim vještinama (4). Napredovanjem bolesti simptomi postaju toliko izraženi da u konačnici dovode do nemogućnosti obavljanja svakodnevnih aktivnosti, zbog čega je potreban stalni nadzor i skrb. AB u većini slučajeva pogađa osobe starije od 65 godina (2). Prevalencija iznosi približno 10% za osobe starije od 65 godina i raste na oko 40% kod osoba starijih od 80 godina (5). Iako u Hrvatskoj još uvijek ne postoji službeni registar oboljelih od AB-a, procjenjuje se da oko 55 000 ljudi ima demenciju, od čega je približno 70% slučajeva povezano s AB-om (6). Prema podacima Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo, prevalencija raste eksponencijalno s dobi: oko 10% osoba starijih od 70 godina ima demenciju, dok u populaciji starijoj od 85 godina taj udio iznosi 20-40% (6). Kako se udio starijeg stanovništva povećava, AB postaje jedan od velikih javnozdravstvenih problema i sedmi je uzrok smrtnosti u svijetu (2).

1.1.1. Neuropatološka obilježja AB-a

Još 1907. godine njemački psihijatar i neuropatolog Alois Alzheimer prvi je primijetio i opisao nakupine amiloidnih plakova i smanjenje broja neurona u mozgu pacijentice Auguste Deter, koja je patila od gubitka pamćenja i promjena osobnosti [4]. Ovo stanje opisao je kao bolest moždane kore, a upravo je po njemu Emil Kraepelin ovo medicinsko stanje nazvao „Alzheimerova bolest“ (3). Upravo se te amiloidne nakupine sastoje od peptida A β , zajedno s neurofibrilarnim snopćima (engl. *neurofibrillary tangles*, NFT) građenim od hiperfosforiliranog proteina tau, smatraju glavnim neuropatološkim obilježjima AB-a (Slika 1.). Uz ove glavne promjene, bolest obilježavaju i gubitak kolinergičkih neurona, neuropala, oksidacijski stres i oštećenje sinapsi, što u konačnici rezultira progresivnom neurodegeneracijom (7).

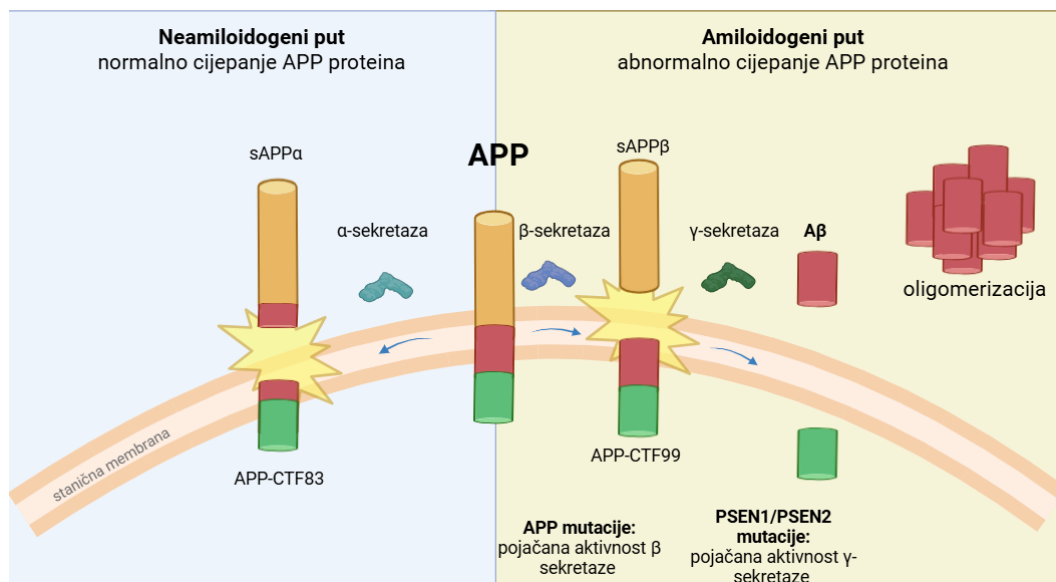


Slika 1. Patološke karakteristike AB-a.

Proteini A β stvaraju se u membranama neurona i oligomeriziraju u izvanstaničnom prostoru, pri čemu nastaju nakupine u obliku plakova koji ometaju normalno funkcioniranje neurona i potiču upalne procese. Neurofibrilarni snopići nastaju agregacijom hiperfosforiliranog proteina tau unutar neurona, čime se narušava vezikularni transport potreban za sinaptički prijenos. Zajednički učinak ovih dvaju procesa povezuje se sa smrću neurona i atrofijom mozga, što dovodi do postupnog kognitivnog propadanja. Preuzeto i prilagođeno od (8).

Protein A β nastaje cijepanjem amiloidnog prekursorskog proteina (APP), proteina dugog 695-770 aminokiselina, koji je snažno eksprimiran u središnjem živčanom sustavu (9,10). APP je transmembranski protein čije cijepanje može imati tri različita ishoda uslijed djelovanje triju različitih proteaza. α -sekretaza i β -sekretaza su proteaze koje se nalaze na površini stanice, dok je γ -sekretaza atipična proteaza koja cijepa membranske proteine unutar njihovih transmembranskih regija. Oko 90% APP-a cijepa α -sekretaza, sprječavajući sintezu peptida A β . Preostalih 10% APP-a se cijepa djelovanjem β i γ -sekretaze, pri čemu nastaju peptidi A β dugi 40 ili 42 aminokiseline (A β -40 ili A β -42) (11). Ovisno o tome koja proteaza cijepa APP, postoje dva puta hidrolize ovog proteina (Slika 2.) (12). U prvom, neamiloidogenom putu, α -sekretaza cijepa protein APP u A β domeni, stvarajući C-terminalni fragment i sAPP α (sekretorni oblik APP-a). sAPP α je izrazito važan za plastičnost i preživljenje neurona (13). S druge strane, u amiloidogenom putu, APP se proteolitički cijepa na C-terminalni fragment β (CTF- β ili C99) i sAPP β pomoću β -sekretaze, a zatim γ -sekretaza cijepa fragment C99, oslobađajući različite peptide (Slika 2.). Među tim peptidima, A β -40 i A β -42 su dominantni u mozgu oboljelih od AB-a, pri

čemu je A β -42 toksičniji i skloniji agregaciji zbog svog hidrofobnog C-terminalnog dijela (14).



Slika 2. Amiloidogeni i neamiloidogeni put procesiranja proteina APP.

U neamiloidogenom putu, APP se cijepa α -sekretazom, stvarajući sAPP α i CTF83 fragment, čime se sprječava stvaranje A β . U amiloidogenom putu, APP se cijepa β -sekretazom, pri čemu nastaje sAPP β i fragment CTF99 kojeg γ -sekretaza cijepa i oslobađa A β . Nakupljanjem i oligomerizacijom peptida A β , dolazi do stvaranja toksičnih nakupina, tzv. amiloidnih plakova. APP - *Amyloid-beta precursor protein*, sAPP - sekretorni oblik proteina APP, CTF - C-terminalni fragment. Slika izrađena u programu BioRender.com.

Smatra se da je prisutnost A β u plakovima jedan od početnih događaja u patologiji AB-a. Zbog svojih hidrofobnih aminokiselina, A β monomeri imaju sklonost agregaciji i formiranju oligomera. Ti oligomeri mogu varirati od niskomolekularnih oblika, kao što su dimeri i trimeri, pa sve do visokomolekularnih oligomera, tj. protofibrila (15). Istraživanja su pokazala da oligomeri A β mogu biti toksičniji od fibrila ili plakova (16,17). Interakcija između hidrofobnih aminokiselina u protofibrilima dovodi do stvaranja fibrila, koji se potom slažu jedan na drugi i tvore plakove (17). Prisutnost plakova u izvanstaničnom prostoru, prvenstveno neurona hipokampusa i korteksa, inducira oštećenje mitohondrija, aktivaciju astrocita i mikroglia, nestabilnu homeostazu i sinaptičku disfunkciju (18,19).

NFT-ovi, kao drugo glavno obilježje AB-a, nastaju agregacijom proteina tau. Protein tau ima višestruke uloge u stanici, a njegova primarna uloga je održavanje stabilnosti mikrotubula i reguliranje unutarstaničnog transporta (20,21). Osim toga, sudjeluje u očuvanju sinaptičke funkcije te u regulaciji neuronske signalizacije. Tau je fosfoprotein, čija fosforilacija i defosforilacija ovisi o ravnoteži aktivnosti protein-kinaza i protein-fosfataza. U fiziološkim uvjetima, tau posjeduje mali broj fosforilacijskih mjesta te negativno regulira vlastito vezanje na mikrotubule (22). Međutim, u patološkim stanjima dolazi do pretjerane fosforilacije proteina tau. Hiperfosforilirani tau prisutan je i u drugim neurodegenerativnim bolestima, poznatim kao tauopatije, među kojima se, osim AB-a, ističu i frontotemporalna demencija, progresivna supranuklearna paraliza, Pickova bolest te kortikobazalna degeneracija. U AB-u dolazi do hiperfosforilacije proteina tau, nakon čega se akumulira u neuronima i formira spiralne fragmente. Abnormalno vezanje hiperfosforiliranog tau na mikrotubule uzrokuje njihovu destabilizaciju i posljedično dovodi do poremećaja aksonskog transporta (23). Patofiziološki mehanizmi koji stoje iza agregacije proteina tau još uvijek nisu u potpunosti razjašnjeni. Prvotno se smatralo da su upravo NFT-ovi glavni uzrok u patogenezi tauopatija. Međutim, u novije vrijeme sve je veći naglasak na proučavanju patogenog potencijala oligomera proteina tau, koji predstavljaju prekursore u nastanku NFT-ova. Ovi oligomeri nastaju udruživanjem posttranslacijski modificiranih tau monomera, što naglašava važnost postranslacijskih modifikacija u njihovom formiranju (24–27). Smatra se da upravo oni posreduju oštećenju neurona i potiču neurodegeneraciju, dok neka istraživanja pokazuju da NFT-ovi mogu djelovati i zaštitno protiv neuronske smrti u tauopatijama (28). Iako je toksičnost različitih oblika proteina tau još uvijek predmet istraživanja, smatra se da su monomeri, ravni i spiralni filament i te NFT-ovi netoksični oblici (29), dok se toksičnim oblicima smatraju dimeri/trimeri, mali oligomeri (300-500 kDa) te granularni tau oligomeri (~1800 kDa) (30–33).

1.1.2. Tijek bolesti i klinička obilježja AB-a

Napredovanje AB-a, od promjena u mozgu koje još ne uzrokuje vidljive simptome, preko onih koje uzrokuju probleme s pamćenjem i razmišljanjem, te koje naposljetku dovode do gubitka fizičke samostalnosti, naziva se kontinuumom AB-a (34). Unutar kontinuumu AB-a razlikuju se tri faze: pretklinička faza AB-a, blago neurokognitivno oštećenje uzrokovano AB-om te demencija uzrokovana AB-om, koja se još naziva i Alzheimerova demencija. Faza Alzheimerove demencije može se podijeliti na blagu, umjerenu i tešku demenciju (Slika 3.).



Slika 3. Kontinuum AB-a: napredovanje bolesti od promjena u mozgu na molekularnoj razini do vidljivih promjena i simptoma koji ozbiljno narušavaju svakodnevno funkcioniranje. Preuzeto i prilagođeno prema (2).

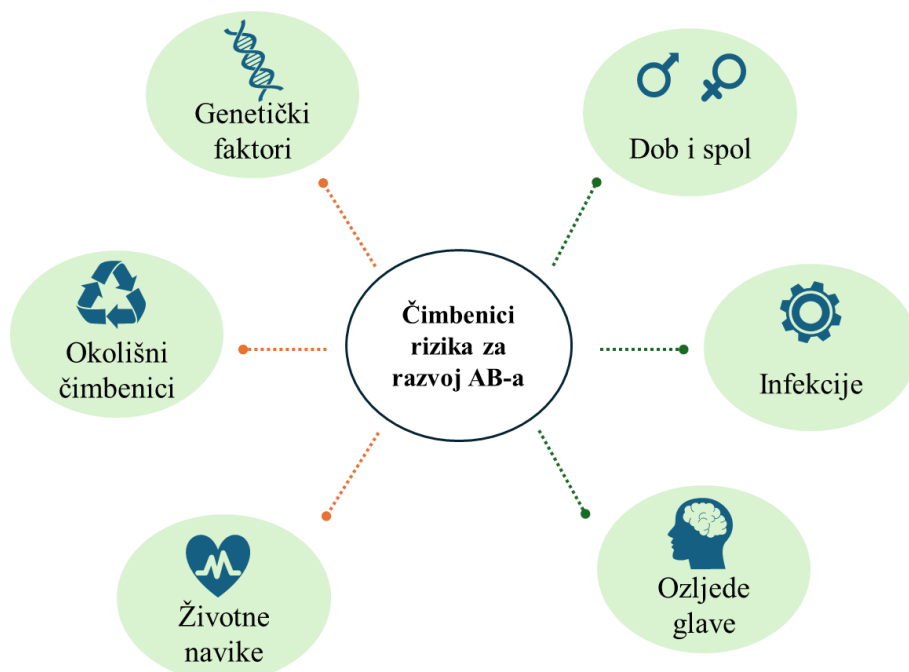
U pretkliničkoj fazi AB-a mogu se uočiti mjerljive promjene u mozgu koje ukazuju na početak AB-a, ali još uvijek nisu prisutni simptomi bolesti, poput gubitka pamćenja ili poteškoća u razmišljanju. Takve promjene uključuju prisutnost amiloidnih plakova i hiperfosforiliranog proteina tau, smanjeni metabolizam glukoze vidljiv na snimkama pozitronsk emisijske tomografije (PET) te smanjene razine proteina tau u cerebrospinalnoj tekućini (35–37). Smatra se da tijekom ove faze mozak još uvijek kompenzira nastale promjene, što omogućuje normalno funkcioniranje. Blagi neurokognitivni poremećaj (engl. *mild cognitive impairment*, MCI) je prijelazno stanje između normalnog starenja i demencije. MCI pogađa oko 10-15% osoba starijih od 65 godina (38–40). Kod osoba s MCI-jem oko 15% njih razvije demenciju unutar dvije godine (41), dok približno trećina oboljelih razvije AB unutar pet godina (42). Osobe se MCI-jem kod kojih će se u konačnici dijagnosticirati AB, imaju biomarkere koji ukazuju na promjene u mozgu karakteristične za AB, ali uz pojavu suptilnih simptoma poput problema s pamćenjem i razmišljanjem.

U blagom obliku Alzheimerove demencije većina osoba pokazuje simptome kao što su dezorijentacija i gubitak koncentracije, ali još uvijek mogu samostalno funkcionirati. U srednjem, umjerenom stadiju Alzheimerove demencije osobe pokazuju izraženije poteškoće s pamćenjem i prepoznavanjem obitelji i prijatelja te probleme u govoru, čitanju i pisanju. U posljednjem, teškom stadiju bolesti zastupljeni su teški simptomi, poput neprepoznavanja obitelji, nepokretnosti, poteškoće s gutanjem i kontrolom mokrenja (34). Zbog brojnih komplikacija koje prate ovu fazu bolesti, na kraju dolazi do smrti. Uz kognitivne simptome, AB karakteriziraju i različiti neuropsihijatrijski simptomi, poput agresije, apatije, depresije, psihoze i poremećaja spavanja (43).

1.1.3. Čimbenici rizika AB-a

Uzrok AB-a još uvijek nije u potpunosti razjašnjen, ali smatra se da je dob jedan od najvažnijih čimbenika rizika za razvoj ove bolesti. Učestalost Alzheimerove demencije značajno raste s dobi, ali je važno istaknuti da AB nije normalan dio starenja te da samo starenje ne uzrokuje bolest. AB je multifaktorska i kompleksna bolest koja je rezultat kombinacije starenja, genetskih i okolišnih čimbenika te načina života (Slika 4.). AB se prema uzroku i dobi pojavljivanja može podijeliti na rani oblik (engl. *early-onset Alzheimer's disease*, EOAD) i kasni ili sporadični oblik (engl. *late-onset Alzheimer's disease*, LOAD). EOAD čini oko 5-10% slučajeva, a simptomi se javljaju prije 65 godine (44). Ove osobe pokazuju značajnu varijabilnost u kliničkim i neurobiološkim obilježjima, što zahtijeva različite pristupe u liječenju. Nasljednost ovog oblika bolesti procjenjuje se na 92-100% (45). EOAD se smatra obiteljskim oblikom bolesti jer se nasljeđuje autosomalno dominantno (46) i povezan je s mutacijama u genima za APP te presenilin-1 i -2 (PSEN1 i PSEN2) (47,48). APP mutacije povezane su s povećanom proizvodnjom i nakupljanjem A β (49), dok PSEN1 i PSEN2 mutacije ometaju djelovanje γ -sekretaze, što rezultira agregacijom A β u mozgu (50). S druge strane, LOAD je češći oblik bolesti i javlja se kod osoba starijih od 65 godina (51). Polimorfizmi gena koji kodira za apolipoprotein E (APOE) utječu na metabolizam lipida te na njegovu interakciju s peptidom A β (52). Postoje tri alela gena APOE, ϵ 2, ϵ 3 i ϵ 4, gdje alel ϵ 4 predstavlja najznačajniji genetski rizični čimbenik za LOAD. Heterozigotni nositelji ϵ 4 imaju oko tri puta veći rizik, dok homozigotni nositelji imaju i do 15% veći rizik za razvoj bolesti (53). Iako prisutnost alela ϵ 4 povećava rizik za razvoj AB-a, važno je naglasiti da to ne znači da će svi nositelji ovog alela razviti simptome bolesti jer u etiologiji AB-a sudjeluju i brojni drugi čimbenici.

Mnogi čimbenici srednje i kasnije životne dobi koji povećavaju rizik od kardiovaskularnih bolesti povezani su i s većim rizikom za razvoj AB-a (54). Ti čimbenici uključuju neliječenu ili nekontroliranu hipertenziju (55–57), pušenje (58,59) i dijabetes (60,61). Osim toga, tjelesna aktivnost i zdrava prehrana također su povezane sa smanjenim rizikom za nastanak kardiovaskularnih bolesti pa tako i rizika za razvoj demencije (62–64). Smatra se da obrazovanje i mentalno stimulativne aktivnosti doprinose povećanju „kognitivne rezerve“, odnosno sposobnosti mozga da učinkovito obavlja kognitivne zadatke unatoč promjenama koje dolaze sa starenjem (65,66), čime se smanjuje rizik za AB u kasnijoj životnoj dobi (67,68).

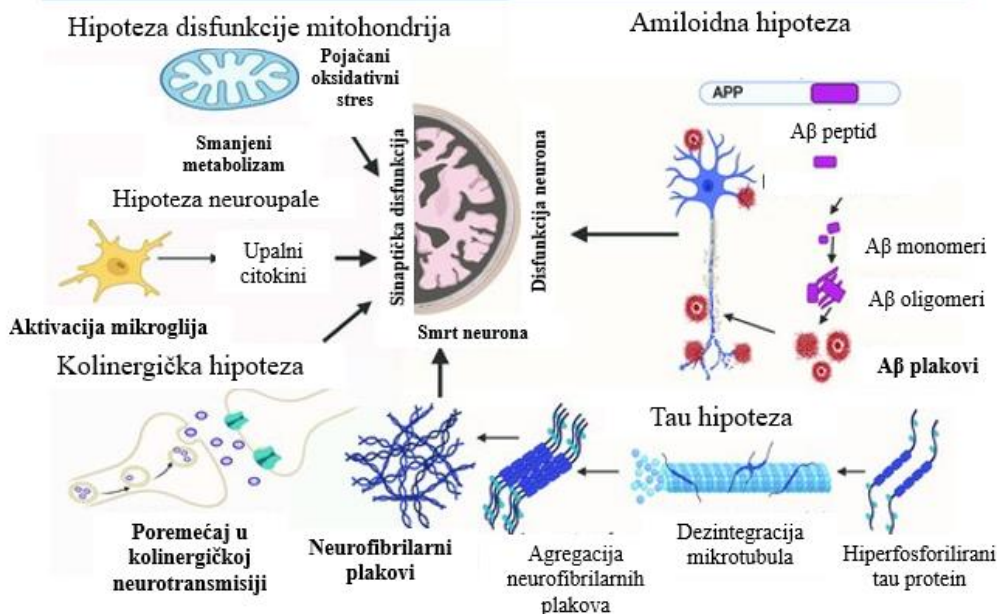


Slika 4. Čimbenici rizika za razvoj Alzheimerove bolesti.

1.1.4. Hipoteze nastanka AB-a

Predložene su brojne hipoteze nastanka AB-a, poput kolinergičke, amiloidne, tau, mitohondrijske disfunkcije, neuroupalne i hipoteze oksidativnog stresa (Slika 5.).

HIPOTEZE NASTANKA ALZHEIMEROVE BOLESTI



Slika 5. Predložene hipoteze nastanka Alzheimerove bolesti. Preuzeto i prilagođeno prema (69).

Kolinergička hipoteza ujedno je i najstarija, a predstavlja osnovu većine danas dostupnih terapijskih pristupa AB-a (70). Prema ovoj hipotezi, u AB-u dolazi do smanjene proizvodnje i prijenosa acetilkolina, koji ima ključnu ulogu u pamćenju i učenju. U uznapredovalom stadiju AB-a, broj kolinergičkih neurona znatno se smanjuje, zajedno s aktivnošću enzima kolin-acetiltransferaze (71).

Amiloidna hipoteza smatra se najprihvaćenijom u znanstvenoj zajednici jer objašnjava nastanak senilnih plakova i nakupljanje Aβ oligomera kao ključnu značajku bolesti (72). Cijepanjem proteina APP β- i γ-sekretazom dolazi do nastanka fragmenata Aβ koji se potom slažu u plakove (73–75). Prisutnost ovih plakova uzrokuje metaboličke promjene, nakupljanje proteina tau, oksidacijski stres i neravnotežu u homeostazi kalcija.

Prema tau hipotezi, predloženoj 2009. godine (76), abnormalno fosforiliranje tau proteina uzrokuje depolimerizaciju mikrotubula i ometa prienos signala (77). Sve više dokaza upućuje na povezanost specifičnih oblika abnormalnog proteina tau s progresijom bolesti te na mogućnost pojave tau patologije i prije formiranja amiloidnih plakova (78,79).

Hipoteza mitohondrijske disfunkcije ističe mitohondrije kao ključne organele u razvoju bolesti. U mozgu oboljelih uočene su promjene poput smanjenja mase, morfologije i

respiratornog kapaciteta mitohondrija (80), što je povezano s oksidativnim stresom, apoptozom i drugim procesima koji doprinose propadanju neurona (81).

Hipoteza neuroupale naglašava ključnu ulogu kronične upale u patogenezi AB-a. Dugotrajna upala potiče razvoj i napredovanje bolesti, a povišene razine upalnih medijatora, poput citokina i kemokina, u mozgu oboljelih mogu oštetiti neurone i narušiti kogniciju (82). Mikroglia, imunološke stanice središnjeg živčanog sustava, imaju dvostruku ulogu u AB-u. U normalnim uvjetima one uklanjaju stanične ostatke i pogrešno složene proteine, a u ranim fazama AB-a imaju neurozaštitni učinak, pri čemu smanjuju nakupine proteina A β i tau (83). Međutim, u kasnim fazama bolesti, zbog dugotrajne izloženosti amiloidnim plakovima i nakupinama proteina tau, dolazi do prekomjerne aktivacije mikroglia i pretjeranog otpuštanja proupalnih citokina, kemokina i reaktivnih kisikovih vrsta (engl. *reactive oxygen species*, ROS), što dodatno oštećuje neurone (84,85).

Hipoteza oksidativnog stresa pretpostavlja da povišene razine ROS-a i posljedična oksidativna oštećenja imaju ključnu ulogu u razvoju i napredovanju bolesti (86). ROS-ovi su visoko reaktivne molekule koji oštećuju važne stanične komponente, poput lipida, proteina i DNA, uzrokujući posljedično i neurodegeneraciju (87). Iako svaka od ovih hipoteza daju vrijedan uvid u patogenezu bolesti, nijedna od još nije u potpunosti razjasnila nastanak AB-a.

1.1.5. Neuroupala i oksidativni stres u AB-u

Neuroupala je povezana s oštećenjem i smrću neurona uzrokovanom upalnim procesom. Donedavno se smatralo da je središnji živčani sustav imunološki privilegirano mjesto, odnosno nepropusna barijera za imunološke stanice i ostale čimbenike s periferije (88),(89). Međutim, danas se zna da krvno-moždana barijera nije nepropusna i statična u fiziološkim uvjetima, već da se njezina propusnost može mijenjati kao odgovor na traumu, stres, lijekove, ali i tijekom starenja i neurodegenerativnih bolesti (90,91). Prvi dokazi da AB ima neuroupalnu komponentu pojavili su se prije dva desetljeća, kada su u osjetljivim regijama mozga pacijenta s AB-om otkrivene aktivirane mikroglia stanice koje eksprimiraju MHC (engl. *Major histocompatibility complex*) proteine i upalne citokine povezane s amiloidnim plakovima (92,93). Pokazano je da upalni medijatori povezani s lezijama u mozgu AB pacijenta nisu perifernog porijekla, već da ih lokalno proizvode mikroglia, astrociti i neuroni. Upravo su ovakva saznanja dovela do razvijanja upalne hipoteze, koja pretpostavlja da upalni čimbenici proizvedeni u mozgu mogu oštetiti aksonske procese ili sinapse te potaknuti smrt neurona (94,95). Tvari koje otpuštaju

umirući neuroni aktiviraju mikroglia stanice, koja potom pokreće regrutaciju i proliferaciju astrocita, aktivno pojačavajući upalni odgovor na izvanstanične nakupine peptida A β (94,95). Ovaj događaj je popraćen nakupljanjem upalnih citokina, aktivacijom MHC sustava i indukcijom upalnih enzimskih sustava poput inducibilne sintaze dušikovog oksida i ciklooksigenaze 2 (96). Svi ovi čimbenici, bilo pojedinačno ili u međudjelovanju, mogu pridonijeti disfunkciji neurona i smrti koja se javlja u AB-u (97). U mozgu pacijenata s AB-om identificirane su povišene razine upalnih citokina i kemokina, uključujući interleukin-1 (IL-1), interleukin-6 (IL-6), interleukin-8 (IL-8), TNF- α (engl. *tumor necrosis factor- α*) i TGF- β (engl. *tumor growth factor- β*), u usporedbi s kontrolnim ispitanicima iste dobi (92,98). Prisutnost visokih razina upalnih citokina u plazmi (IL-12, IL-6, IL-8) identificirana je kao mogući prediktor konverzije iz MCI-ja u AB (99). Istraživanja na životinjama pokazala su da su prekomjerne količine upalnih citokina povezane s poremećajima pamćenja i kognitivnog propadanja (100,101). Nadalje, upalni čimbenici poput citokina i ROS-a mogu promijeniti supstratnu selektivnost i aktivnost kinaza/fosfataza, što dovodi do fosforilacije proteina tau (102), dok citokini poput TNF- α i IFN- γ (interferon- γ), mogu pojačati nakupljanje A β (103). Ovo pruža osnovu za pretpostavku da neuroupala može biti poveznica između taloženja A β i formiranja neurofibrilarnih snopića.

Mozak je posebno osjetljiv na oksidativna oštećenja jer ima povišenu potrošnju kisika, visoke razine polinezasićenih masnih kiselina, niske razine antioksidansa i relativno visoke razine prijelaznih metalnih iona u redoks reakcijama (104,105). Stresni ili patogeni uvjeti mogu izazvati oksidativni stres narušavanjem ravnoteže između stvaranja oksidansa i antioksidativne obrane, što dovodi do povećane razine ROS-a (106). Ove reaktivne vrste mogu djelovati na proteine, lipide, ugljikohidrate i nukleinske kiseline, uzrokujući oksidativno oštećenje tih biomolekula. Oksidativni stres može potaknuti i prekomjernu proizvodnju dušikovog oksida koji je ključni signalni i redoks čimbenik u mozgu uključen u kontrolu sinaptičke aktivnosti, ali i u neurodegenerativne procese, poput upalnih odgovora (107). Reakcijom dušikovog oksida s kisikovim radikalima mogu se generirati druge reaktivne dušikove vrste (engl. *reactive nitrogen species*, RNS), koji zajedno s ROS-om mogu inhibirati komponente staničnog disanja, narušavajući stanični energetski metabolizam (108). U mozgu pacijenata s AB-om, kao i u animalnim modelima, oksidativni stres je vidljiv kroz povišene razine markera oksidativnog stresa (109). Pokazano je da su povišene razine peroksidacije lipida, oksidacije proteina i nukleinskih kiselina te produkata napredne glikacije prisutne u hipokampusu i entorhinalnom korteksu u mozgu AB-a (110). Proteomske analize mozga pacijenata s AB-om identificirale su veliki broj oksidiranih proteina koji imaju ključnu ulogu u vitalnim staničnim funkcijama, poput puteva energetskog metabolizma (111). Nadalje, pokazano je da je oksidativno oštećenje rani događaj u patologiji AB-a jer su već u mozgu osoba s

MCI-jem utvrđene povišene razine oksidativnih markera (112). Ovi dokazi slažu se s ključnom ulogom Aβ u stvaranju ROS-a i RNS-a koji dodatno doprinose oksidativnom stresu u patogenezi AB-a (113).

1.1.6. Metaboličke promjene u AB-u

Neuronska aktivnost zahtijeva veliku količinu energije, a mozak troši do 20% ukupne količine kisika u organizmu (114). Smanjena metabolička aktivnost mozga može doprinijeti razvoju kognitivnih oštećenja i smatra se jednim od najranijih znakova AB-a (115). Primjenom slikovnih tehnika, poput magnetske rezonance (engl. *magnetic resonance imaging*, MRI) i PET-a, otkriven je rani, selektivni gubitak volumena i promjene u metabolizmu glukoze u medijalnom temporalnom režnju kod pacijenata s AB-om (116). Osim toga, kod AB-a karakteristično se opaža degeneracija bazalnih prednjih kolinergičkih neurona i smanjenje metabolizma glukoze u mozgu što ukazuje na poremećaj energetskog metabolizma i napredovanje bolesti (117). U posljednjih nekoliko godina ističe se da je AB metabolička bolest te je čak i predloženo da se AB kategorizira kao dijabetes tipa 3 (118). Metaboličke promjene prisutne u AB-u, uključuju promjene u metabolitima glikolitičkog puta (119,120), promjene razine različitih aminokiselina (119,121) te promjene u metabolizmu lipida, osobito masnih kiselina (119), glicerofosfolipida (121,122), sfingolipida (123), fosfolipida (119) i acilkarnitina (120). Ovi poremećaji upućuju na disfunkciju mitohondrija, poremećen metabolizam glukoze i lipida kao ključne značajke AB-a (124).

Promjene u razinama aminokiselina jedna su od glavnih metaboličkih promjena uočene u AB-u. Aminokiseline su prekursori različitih metabolita i lipida, uključenih u različite metaboličke puteve, kao što su stanično signaliziranje i regulacija ekspresije gena (125). U središnjem živčanom sustavu, aminokiseline poput glutaminske kiseline, γ-aminobutirična kiseline (GABA), asparaginske kiseline i glicina, imaju ključnu ulogu u neurotransmisiji (126). Glutamat je glavni ekscitatorni neurotransmiter neokortikalnih i hipokampalnih piramidalnih neurona te je izuzetno važan u procesima učenja i pamćenja (127). Poremećaji u glutamatoj ekscitatornoj neurotransmisiji povezani su s brojnim neurološkim bolestima, poput AB-a (127), ishemijskog oštećenja mozga (128) te bolesti motoričkih neurona (129). Za sintezu katekolaminskih neurotransmitera, koji su neophodni za normalno kognitivno funkcioniranje, odgovorni su fenilalanin i tirozin (130). Stoga promjene u razinama ovih aminokiselina utječu na sintezu katekolamina, što posljedično može doprinijeti kognitivnim i emocionalnim oštećenjima (131). Energetski metabolizam također je značajno promijenjen u AB-u (132). Istraživanja su pokazala da je u AB-u narušen energetski metabolizam djelovanjem više međusobno povezanih

putova u različitim dijelovima mozga, a posebno se ističu putevi metabolizma glicina, serina i treonina (133). Promjena u metabolitima ciklusa limunske kiseline (TCA), ključnog za proizvodnju ATP-a, upućuju na smanjenu proizvodnju energije u mozgu AB-a (134). Ključan aspekt patofiziologije AB-a predstavljaju i promjene u metabolizmu lipida (135). Promjene u razinama slobodnih masnih kiselina, osobito polinezasićenih masnih kiselina, vrlo su čest nalaz brojnih istraživanja metaboličkih promjena u AB-u. Primjerice, dokosaheksaenska kiselina (DHA) je omega 3 masna kiselina, važna za održavanje strukturnog integriteta mozga te kognitivne funkcije, čije su razine snižene u AB-u (136,137). Arahidonska kiselina, koja sudjeluje u regulaciji kognitivnih funkcija, sinaptičke plastičnosti i upalnih procesa, ima povišene razine u AB-u (138). Glicerofosfolipidi imaju ključnu ulogu u održavanju strukturne stabilnosti, signalizaciji i sinaptičkoj aktivnosti. Brojna istraživanja pokazala su snižene razine glicerofosfolipida, uključujući fosfatidilkoline (PC), fosfatidiletanolamine (PA) i fosfatidilinozitole (PI), u mozgu pacijenata s AB-om u odnosu na zdrave kontrole istih godina (139–141). Smanjene razine PC-a u mozgu bolesnika s AB-om povezuju se s abnormalnom aktivnošću enzima fosfolipaze A2 (PLA2), koja razgrađuje masne kiseline iz fosfolipida, stvarajući slobodne masne kiseline i lizofosfatidilkoline (lysoPC) (142). Aktivnost PLA2 dodatno je pojačana u prisutnosti peptida A β , glavnog sastojka amiloidnih plakova, što dodatno doprinosi poremećaju lipidnog metabolizma i neuroupale (143).

Konačno, ovi poremećaji u metabolizmu aminokiselina, lipida i energije pokazuju opseg metaboličkih promjena u AB-u. Utvrđivanje prisutnosti ovih promjena predstavlja osnovu za daljnje proučavanje patogeneze bolesti i čine korak bliže ka otkrivanju potencijalnih biomarkera u budućim dijagnostičkim i terapijskim protokolima.

1.1.7. Animalni modeli u istraživanjima AB-a

Animalni modeli imaju važnu ulogu u istraživanju patogeneze AB-a te u ispitivanjima terapijskih potencijala različitih molekula. Posljednjih desetljeća brojni lijekovi kandidati pokazali su obećavajuće učinke u pretkliničkim modelima, ali nažalost nisu potvrdili kliničku učinkovitost (144). Jedan od mogućih razloga može biti neprikladan odabir pretkliničkih modela. Sisavci, poput glodavaca, dijele značajnu fiziološku i genetsku sličnost s ljudima, zbog čega rezultati dobiveni na animalnim modelima mogu pružiti uvid u ljudske bolesti. Iako nijedan animalni model ne može u potpunosti reproducirati sve patološke i bihevioralne značajke oboljelih od AB-a, trenutno dostupni modeli mogu, barem djelomično, replicirati nekoliko ključnih značajki bolesti (145). Animalni modeli koji se mogu koristiti u istraživanju AB-a su ne-ljudski primati, psi, štakori, miševi, zebrice, *Drosophila melanogaster* i kvasci (146). Zbog različitih patoloških i patofizioloških

faktora, modeli se mogu podijeliti na spontane, intervencijske i genetski modificirane modele (147). Otkrivanje mutacija u genima poput APP-a, PSEN1 i PSEN2 povezanih s obiteljskim oblikom AB-a (47), dovelo je do razvoja brojnih modela amiloidne patologije, dok mutacije humanog MAPT gena povezane s neurodegeneracijom (148), iskorištene su za razvoj modela tau patologije. Do danas je razvijeno više od 200 transgeničnih modela AB-a većinom temeljenih na amiloidnoj i tau patologiji (145).

Zbog svog kratkog životnog vijeka i reproduktivnog ciklusa, dostupnosti i relativno jeftinog uzgoja, miševi su vrlo čest model u istraživanjima mnogih bolesti, pa tako i AB-a. Najčešće korišteni APP transgenični mišji modeli uključuju Tg2576 (149), APP23 (150,151), TgCRND8 (152,153) i J20 (154). Ovi modeli razvijaju A β patologiju praćenu neuroupalom, sinaptičkom disfunkcijom, gubitkom neurona te kognitivnim i bihevioralnim oštećenjima. Neki od transgeničnih mišjih modela temeljenih na tau patologiji su modeli hTau.P310S (155), hTau (156), rTg (tauP301L) 4510 (157) i THY-Tau22 (158). Unatoč tome što razvijaju tau patologiju praćenu sinaptičkom disfunkcijom i gubitkom neurona, ovim modelima nedostaje amiloidna patologija (156–159). Stoga su razvijeni multitransgenični modeli koji razvijaju obje ključne karakteristike AB-a. Najpoznatiji multitransgenični i danas najčešće korišteni mišji model AB-a je 3xTg-AD. Ovaj model nosi mutacije u genima APPSwe, MAPT P301L i PSEN1 M146V te razvija i amiloidnu i tau patologiju (160). Izvanstanično nakupljanje A β u korteksu pojavljuje se već u dobi od 6 mjeseci, a do 12. mjeseca postaje izraženije, dok se hiperfosforilirani tau nakuplja u hipokampusu nešto kasnije, između 12. i 15. mjeseca (160), (161). Neuroupala i poremećaji u sinaptičkoj funkciji mogu se uočiti čak i prije pojave prvih amiloidnih plakova (160,162). Ovi miševi pokazuju rani intraneuralni A β -povezani kognitivni deficit već u dobi od 4. mjeseca koji se očituje kao smanjena sposobnost zadržavanja informacija (161). Stoga ovaj model učinkovito oponaša brojne fenotipove povezane s AB-om i smatra se jednim od najprikladnijih za istraživanje patogeneze i razvoj novih lijekova.

1.1.8. Terapijski pristup i izazovi u liječenju AB-a

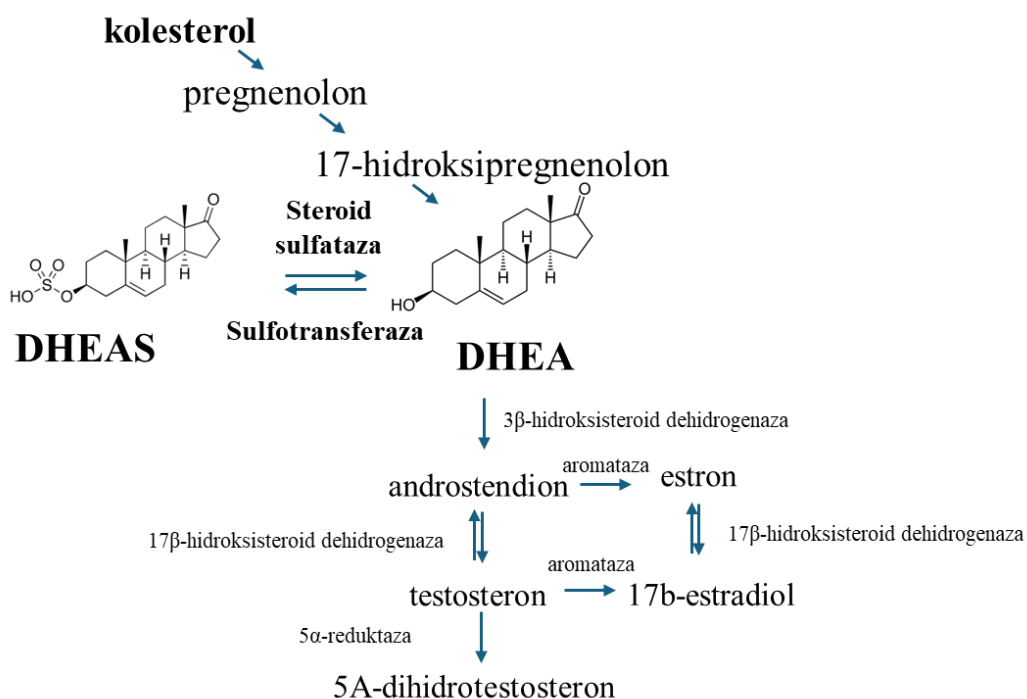
Trenutno dostupne terapije za AB temelje se na lijekovima koji usporavaju napredovanje demencije i privremeno poboljšavaju kvalitetu života, pružajući nedovoljan učinak na kognitivno propadanje. Među tim lijekovima su donepezil, galantamin i rivastigmin, koji su inhibitori acetilkolinesteraze (engl. *Acetylcholinesterase inhibitors*, AChEI), te memantin koji spada u skupinu antagonista N-metil-D-aspartatnih (NMDA) receptora. AChEI sprječavaju razgradnju acetilkolina inhibicijom enzima acetilkolinesteraze, što dovodi do povećane razine acetilkolina u sinapsama i pojačane kolinergičke

neurotransmisije, a primjenjuju se u terapiji blagog i umjerenog stadija AB-a (163). Memantin djeluje na način da sprječava prekomjernu aktivaciju glutamatnih receptora usporavanjem protoka kroz NMDA receptore (164). Primjenjuje se kao monoterapija za ublažavanje simptoma umjerenog i teškog stadija AB-a. Istraživanja su pokazala da memantin može imati povoljan učinak u usporavanju kognitivnog propadanja kod osoba oboljelih od AB-a (165). Kombinirana terapija memantina i donepezila pokazala se uspješnom u vidu poboljšanja kognitivnih funkcija bolesnika i omogućavanja obavljanje svakodnevnih aktivnosti (166). Kako je AB karakteriziran i prisutnošću nekognitivnih simptoma, koji značajno doprinose heterogenosti bolesti, često se za ublažavanje pojedinih simptoma primjenjuju i lijekovi poput antipsihotika, antidepresiva i antikonvulziva (167). Posljednjih godina bilježi se veliki napredak u istraživanju patofizioloških mehanizama AB-a što je dovelo do novih spoznaja te otvaranja novih potencijalnih terapijskih ciljeva. Istraživanja amiloidnih i tau proteina otvorila su nove pristupe terapijama koje modificiraju tijek bolesti, dok su neuroupala i mitohondrijska disfunkcija istaknute kao obećavajuća područja istraživanja (168). Jedna od strategija je ciljanje enzima uključenih u nastanak A β i proteina tau. Drugi pristup usmjeren je na poticanje uklanjanja A β i proteina tau iz moždanog tkiva primjenom pasivne imunoterapije (169). Na temelju toga razvijeno je više monoklonskih protutijela koja ciljaju različite faze formiranja A β plakova i potiču njihovo uklanjanje. Primjerice, aducanumab i donanemab djeluju na plakove, lecanemab djeluje na oligomere i protofibrile, dok se solanezumab veže isključivo na A β monomere (170). Međutim, primjena monoklonskih antitijela ograničena je nuspojavama koje su ovisne o dozi lijeka, a manifestiraju se kao neuroslikovne abnormalnosti povezane s amiloidom (engl. *Amyloid-Related Imaging Abnormalities*, ARIA), a očituju se razvojem cerebralnog edema ili mikrokrvarenja u mozgu (171). Trenutno su lecanemab i donanemab jedini lijekovi odobreni od strane Američke agencije za hranu i lijekove jer su pokazali pozitivan učinak na usporavanje progresije bolesti i očuvanje kognitivnih funkcija (172,173).

1.2. Dehidroepiandrosteron i njegov sulfat (DHEAS)

Dehidroepiandrosteron (DHEA) i njegov sulfatni oblik (DHEAS) najzastupljeniji su steroidni hormoni u čovjeka (174). Kolesterol služi kao prekursor za sintezu steroida DHEA, pri čemu se pomoću enzima CYP11A1 prevodi u pregnenolon, a on se dalje enzimom CYP17A1 pretvara u DHEA-u. Dalje se DHEA prevodi u svoj sulfatni oblik, DHEAS, a glavni enzim odgovoran za tu konverziju je sulfotransferaza (SULT2A1) (Slika 6.) (175). DHEAS predstavlja stabilniji, cirkulirajući oblik te je u krvi prisutan u omjeru 1000:1 u odnosu na slobodni oblik DHEA (176). DHEA se može dalje metabolizirati u androgene

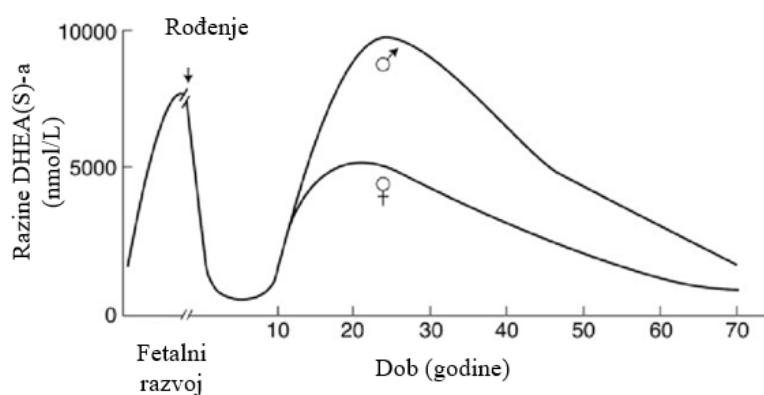
i estrogene spojeve te služi kao prekursor za biosintezu spolnih hormona (177). Sintaza se odvija u zoni retikularis nadbubrežne žlijezde, ali i u drugim organima poput posteljice, jajnika, testisa, prostate, i jetre (178). Međutim, DHEA(S) se može i sintetizirati *de novo* u mozgu, i to u neuronima, astrocitima i oligodendrocitima (179). Budući da su koncentracije DHEA(S) 6 – 8 puta više u mozgu nego u perifernoj krvi, ovi steroidi se ubrajaju u skupinu neurosteroida (180). DHEA(S) svoje djelovanje ostvaruje vezanjem na veliki broj receptora, uključujući estrogene i androgene receptore (181,182), različite receptore u plazmatskoj membrani (183,184) te na naponske kalcijeve kanale (185). Na ovaj način DHEA(S) sudjeluje u brojnim signalnim putevima što naglašava važnost ovog neurosteroida u različitim fiziološkim sustavima, uključujući središnji živčani sustav (186), imunološki sustav (187), kao i u rastu i razvoju tijela (188). DHEA(S) sudjeluje u modulaciji neuronske plastičnosti regulirajući smrt, odnosno preživljenje neurona, osobito tijekom razvoja mozga (189–191). Brojna istraživanja također pokazuju da DHEA(S) ima neuroprotektivno (192,193), protuupalno i antioksidativno djelovanje (194) te značajno utječe na raspoloženje, emocije, kogniciju i ponašanje (195,196).



Slika 6. Shematski prikaz sinteze neurosteroida DHEA(S).

Tijekom fetalnog razvoja, razine DHEA(S)-a su visoke, nakon čega ostaju niske sve do 8.-10. godine života (197). U pubertetu razine DHEA(S)-a počinju rasti, dosežući maksimum

između 20. i 30. godine života, nakon čega postupno opadaju s godinama. U dobi od 60.-80. godine života razine DHEA(S) iznose svega 10-20% svojih maksimalnih vrijednosti (Slika 7.) (198). Taj pad DHEA(S)-a povezan je s promjenama u tjelesnom sastavu, fizičkoj kondiciji, raspoloženju i kogniciji (199). Brojna istraživanja zabilježila su promjene u koncentracijama DHEA(S)-a u serumu kod pacijenata s različitim neuropsihijatrijskim poremećajima, poput anksioznosti, depresije, shizofrenije, posttraumatskog stresnog poremećaja (PTSP) i AB-a (200,201). Uzimajući ovo u obzir, DHEA(S) se smatra potencijalnim ciljem za prevenciju i liječenje različitih psihijatrijskih i neurokognitivnih poremećaja, uključujući i AB.



Slika 7. Razine DHEA(S)-a tijekom života kod muškaraca i žena. Preuzeto i prilagođeno prema (202).

1.2.1. DHEA(S) u AB-u

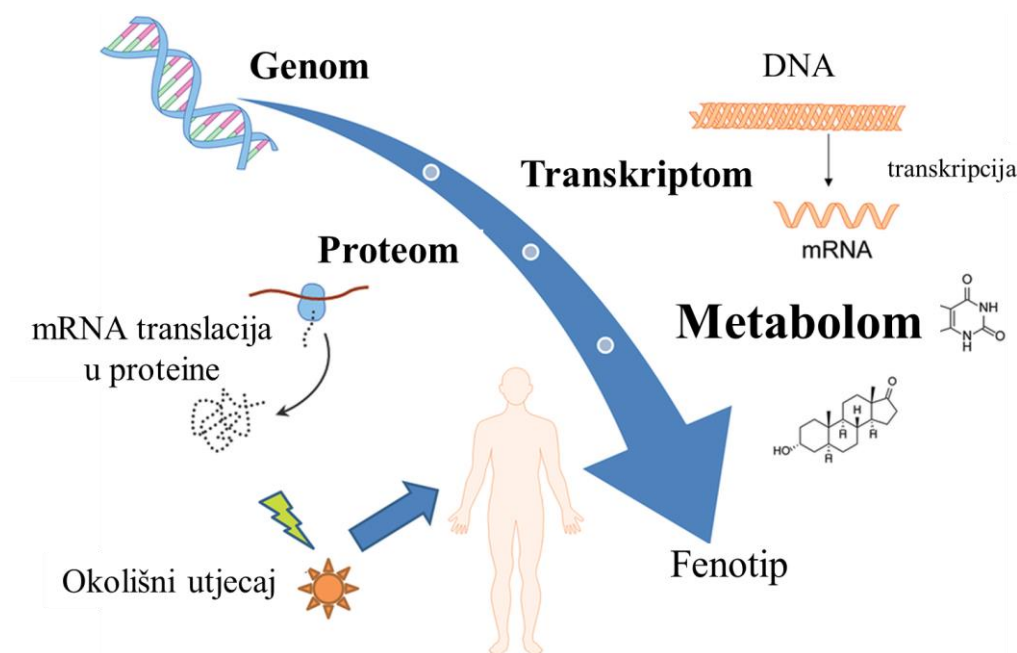
Iako razine DHEA(S)-a u serumu opadaju s godinama, istraživanja su pokazala da su razine ovog neurosteroida promijenjene i u AB-u. Različite kliničke studije pokazale su da pacijenti s AB-om imaju niže razine DHEAS-a u serumu (203,204) te niži omjer DHEAS/DHEA u usporedbi sa zdravim kontrolama (205). Slične rezultate pokazala su i druga istraživanja, ističući da se smanjenje DHEA(S)-a u serumu podudara sa smanjenjem u mozgu i cerebrospinalnoj tekućini (CSF) (206,207). S druge strane, *post mortem* analize mozga pacijenata oboljelih od AB-a pokazale su povišene razine DHEA(S)-a u prefrontalnom korteksu, hipotalamusu i hipokampusu (208). Pokazano je da bi DHEA(S) mogao imati zaštitnu ulogu u slučaju nastanka amiloidnih plakova i povećane razine oksidativnog stresa, jednih od ključnih značajki AB-a. Povećanje razina DHEA(S)-a može biti potaknuto prisutnošću A β -peptida i pojačanim oksidativnim stresom, te bi moglo

predstavljati adaptivni odgovor organizma na nastale promjene (208). Osim toga, pokusi na životinjama pokazali su da primjena DHEA-e smanjuje kognitivna oštećenja u animalnim modelima AB-a (209). Nadalje, istraživanja na stanicama PC12 pokazala su da DHEA djeluje na metabolizam proteina APP, povećavajući njegovu sekreciju izvan stanica (210). Pretpostavlja se da pad razine steroida DHEA u serumu i plazmi koji se javlja starenjem, može dovesti do poremećaja metabolizma proteina APP, a posljedično i formiranja amiloidnih plakova i razvoja AB-a (211). DHEA(S) modulira i fosforilaciju proteina tau zahvaljujući svojoj ulozi u održavanju redoks homeostaze (212). Razine proteina tau negativno koreliraju s razinama DHEA(S)-a u hipotalamasu, što upućuje na njihovu neurozaštitnu ulogu u AB-u (213,214). Brojna istraživanja su potvrdila antioksidativno djelovanje DHEA(S)-a (215,216), iako su neka pokazala da može imati i prooksidativni učinak, ovisno o dozi, mjestu djelovanja i vremenu primjene (215,217). *In vitro* istraživanja upućuju na to da predtretman s DHEA-om inhibira stvaranje hidroksilnih (-OH) radikala stimulacijom peroksidazne aktivnosti te smanjuje ekspresiju proapoptotskih čimbenika (218). Iako se DHEA(S) ne može svrstati kao antioksidans ili prooksidans, očito je da modulira signalne putove uključene u metabolizam ROS-a.

Budući da je AB povezan s povećanim razinama proupalnih citokina i sniženim razinama DHEA(S)-a, pretpostavlja se da snižene razine DHEA(S)-a mogu dovesti do disfunkcije imunološkog sustava i pojačanog oksidativnog stresa (219). DHEA može izravno djelovati na imunološki sustav vezanjem za steroidne receptore na B- i T-limfocitima, monocitima i NK stanicama (220). Pokazano je da inhibira aktivaciju transkripcijskog faktora NF- κ B, smanjuje proliferaciju T stanica te sekreciju proupalnih citokina (IL-1 β , IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, TNF- α i IFN- γ), dok istovremeno povećava izlučivanje IL-2 i IL-4 (220). DHEAS također sudjeluje u regulaciji proupalnih citokina prisutnih u neuritskim plakovima (219). Iako točni molekularni mehanizmi djelovanja DHEAS-a na imunološki sustav u AB-u još uvijek nisu razjašnjeni, jasno je da ovi učinci upućuju na višestruke protuupalne i neurozaštitne mehanizme DHEAS-a (219,221).

1.3. Metabolomika

Metabolomika, zajedno s proteomikom, transkriptomikom i genomikom, čini temelj sustavne biologije te je potaknula interes za proučavanje metabolizma u biologiji i medicini, osobito u području istraživanja biomarkera (Slika 8.) (222).



Slika 8. Pregled različitih *omics*-znanosti poput genomike, proteomike i transkriptomike. Preuzeto i prilagođeno prema (223).

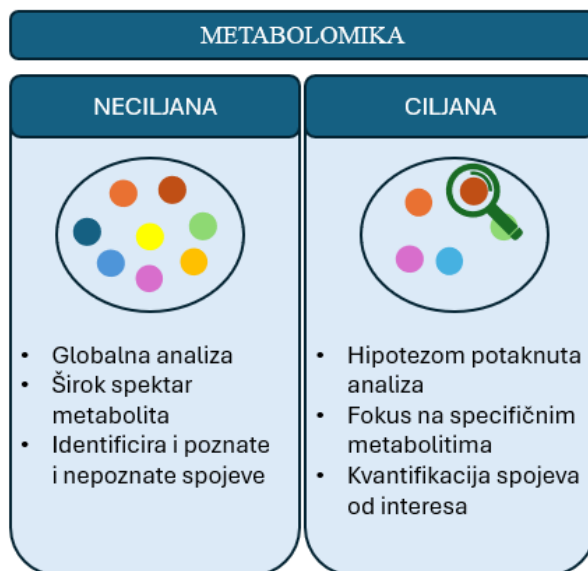
Metabolomika je brzo rastuće znanstveno područje koja se bavi karakterizacijom metabolita te proučava sastav metabolita u različitim tipovima stanica, tkiva, organa ili cijelim organizmima. Metaboliti su intermedijarni ili konačni produkti metabolizma koji usmjeravaju različite stanične procese uključujući energetske metabolizam, apoptozu i signalizaciju (224). Metaboliti su uglavnom nestabilni, kemijski raznoliki spojevi, a u njih ubrajamo i različite aminokiseline, lipide, nukleinske kiseline, vitamine, ugljikohidrate, antioksidanse, organske i masne kiseline (225). Za razliku od gena i proteina, metaboliti pokazuju puno veću varijabilnost te ovise o čimbenicima okoliša, ksenobiotičima, prehrani, stresu te prisutnosti patoloških stanja (226). Skup svih metabolita određene stanice, tkiva, organa ili cijelog organizma naziva se metabolom (227). Metabolom obuhvaća sve metabolite prisutne u biološkim procesima te predstavlja produkt interakcije genotipa i fenotipa s okolišnim čimbenicima. Stoga metabolomika omogućuje razumijevanje složenih interakcija između genotipa i fenotipa, ali i kompleksne metaboličke i biokemijske procese u zdravlju i bolesti (226). Zbog toga metabolomika ima široku primjenu u različitim istraživanjima, poput toksikologije, onkologije, mikrobiologije, farmakologije, neuropsihologije te biotehnologije (228,229). Osim toga, veliki potencijal metabolomike se pokazao u istraživanjima usmjerenima na određivanje i identifikaciju potencijalnih prediktivnih, dijagnostičkih ili prognostičkih biomarkera. Kao izvor metabolita mogu se koristiti različite biološke tekućine poput plazme, seruma, cerebrospinalne tekućine, urina, sline, amnionske tekućine, moždane dijalizate,

trombocite, feces te različite stanice i tkiva. Postoji nekoliko grana metabolomike, uključujući metabonomiku, lipidomiku i fluksomiku (230). Metabonomika se bavi sustavnim proučavanjem metabolita u biološkim sustavima i njihove uloge u fiziološkim procesima, s naglaskom na dinamične odgovore metabolita na vanjske podražaje, promjene u okolišu ili biološke intervencije. Na taj način omogućuje bolje razumijevanje odnosa između metaboličkih promjena i bioloških stanja, što je čini ključnim alatom za razumijevanje složenih bioloških sustava (230). Lipidomika je grana metabolomike usmjerena na analizu lipida i njihovih metaboličkih derivata (231). Ima važnu ulogu u bioinformatici i kliničkim istraživanjima, jer omogućuje identifikaciju lipidnih profila povezanih s bolestima, koji mogu poslužiti kao dijagnostički i prognostički biomarkeri (232). Jedna od novijih grana metabolomike je fluksomika, koja proučava brzine svih unutarstaničnih metaboličkih tokova u biološkim sustavima. Kvantitativnim mjerenjem metaboličkih tokova, pruža informacije o brzinama metaboličkih reakcija, raspodjeli hranjivih tvari te međusobnoj povezanosti metaboličkih putova i ukupnom funkcioniranju metaboličkih mreža (233,234).

1.3.1. Dizajn metabolomskih studija

Ovisno o biološkom pitanju koje je potrebno razriješiti postoje dva pristupa u metabolomskim istraživanjima, to su ciljane i neciljane metabolomske analize (Slika 9.). Većina istraživanja kreće od neciljanog ili globalnog metabolomskog pristupa, koji se ne bazira na prethodno postavljenim hipotezama već služi kako bi se generirala hipoteza za potencijalnu daljnju ciljanu analizu. Neciljana analiza istražuje sve mjerljive metabolite u uzorku te omogućuje otkrivanje metabolita, odnosno promjena u razini pojedinih metabolita, koji mogu predstavljati novi biomarker određenog stanja (235). Glavna prednost je u tome što omogućuje nepristran pristup proučavanju odnosa između međusobno povezanih metabolita iz više metaboličkih puteva. Dok neciljana analiza mjeri široki spektar uočljivih značajki prisutnih u određenom uzorku, ciljana analiza se temelji na analizi podskupa već biokemijskih anotiranih metabolita (236). Ciljana analiza mjeri koncentracije unaprijed definiranih skupa metabolita, stoga omogućuje veću selektivnost i osjetljivost. Određivanje i identifikacija metabolita u neciljanoj analizi provodi se pomoću baza podataka i/ili knjižnica, dok se validacija i kvantifikacija metabolita u ciljanoj analizi temelji na referentnim standardima (224). Primjerice, za metabolit od interesa priprema se standardna krivulja u određenom koncentracijskom rasponu, kako bi se omogućila točna kvantifikacija. Dakle, neciljana analiza pruža kvalitativnu analizu i relativnu kvantifikaciju, dok ciljana analiza omogućuje apsolutnu kvantifikaciju prema standardima poznate koncentracije. Obje metode imaju i svoje nedostatke. Strukturna identifikacija, pristranost detekcije, obrada sirovih podataka i

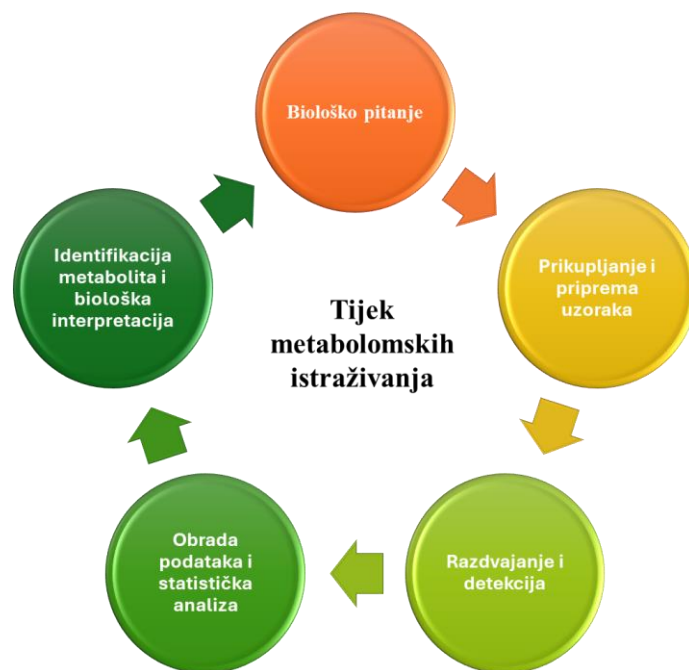
pokrivenost analitičkih tehnika obično predstavljaju najveći izazov u neciljanoj analizi (237).



Slika 9. Usporedba neciljanog i ciljanog metabolomskog pristupa.

1.3.2. Tijek metabolomskih istraživanja

Tijek metabolomskih istraživanja sastoji se od nekoliko koraka: eksperimentalni dizajn, priprema uzoraka i ekstrakcija metabolita, razdvajanje i detekcija, obrada podataka, statistička analiza i biološka interpretacija rezultata (Slika 10).



Slika 10. Prikaz tijeka metabolomskih istraživanja.

Jedan od prvih koraka u svim istraživanjima, pa tako i u metabolomskim jest postavljanje biološkog pitanja, odnosno definiranje biološkog problema te odluka o vrsti i broju uzoraka, istraživačkim skupinama i načinu prikupljanja uzoraka. Odgovarajući eksperimentalni dizajn iznimno je važan jer određuje analitičke postupke (ciljani ili neciljani pristup) i analitičke platforme koje će se koristiti. Sljedeći korak je prikupljanje uzoraka i podataka. Uzorci bi se trebali pripremati prema standardiziranim protokolima, ovisno o vrsti biološkog uzorka te bi trebali biti pravilno pohranjeni kako bi se spriječila degradacija metabolita (235). Sama priprema uzoraka ovisi o analitičkoj tehnici koja će se primjenjivati. Prvi korak u svakoj pripremi uzoraka je deproteinizacija koja se provodi pomoću različitih organskih otapala (hladni acetonitril, metanol, etanol, izopropanol) pojedinačno ili u kombinaciji. Kako bi se postigla precipitacija proteina, omjer uzorka i otapala bi trebao biti 1:3. Međutim, neke tehnike zahtijevaju dodatnu obradu uzoraka, poput plinske kromatografije spregnute sa spektrometrijom masa (GC-MS) jer zahtijevaju kemijsku derivatizaciju spojeva (235). Derivatizacija je postupak kojim se spojevi čine termički stabilnijima i hlapljivijima, a sastoji se od dva koraka. Prvi korak uključuje pretvaranje karbonilnih skupina u oksime, korištenjem O-metoksilamina. Nakon toga slijedi korak sililacije, pri kojem se aktivni vodici zamjenjuju trimetilsililnim skupinama, čime se povećava hlapljivost metabolita. Nakon pripreme uzoraka slijede koraci razdvajanja i detekcije gdje se primjenjuju različite separacijske tehnike, poput tekućinske kromatografije (LC), plinske kromatografije (GC) i kapilarne elektroforeze (CE), te različite analitičke tehnike kao što su spektrometrija masa (MS) ili nuklearna

magnetska rezonanca (NMR) (236). Podaci dobiveni metabolomskom analizom često su vrlo opsežni i složeni pa obrada zahtjeva različite metode prepoznavanja uzoraka i statističke analize (237). Tijekom obrade podataka često se radi filtriranje kako bi se zadržale samo one varijable koje se prisutne u većini uzoraka ili samo u određenoj grupi uzoraka, čime se bolje predstavlja cijela skupina (235). Filtracijom se isključuju i oni metaboliti čija zastupljenost značajno varira između uzoraka kontrole kvalitete. Obrada podataka još podrazumijeva i normalizaciju, skaliranje i transformaciju. Normalizacija podataka se koristi kada se analizira duga serija uzoraka kako bi se smanjila varijabilnost unutar i između serija uzoraka. Logaritamske transformacije su korisne za smanjenje utjecaja *outliera*, dok skaliranje prilagođava doprinos pojedinih spojeva u modelu dijeljenjem s odgovarajućim faktorom skaliranja, a najčešće metode skaliranja su *unit variance* (UV), *Pareto* skaliranje (Par) i *mean centering* (235). Statistička analiza je sljedeći važan korak u metabolomskim istraživanjima jer omogućuje klasifikaciju uzoraka, isticanje značajnih vrijednosti te određivanje korelacije između varijabli (235). Univarijatna statistička analiza testira značajnost jednog metabolita između različitih skupina uzoraka. Kako bi se odredila vrsta testa, prvo se provjerava normalnost raspodjele podataka pomoću Shapiro-Wilk ili Kolmogorov-Smirnov testa. Zatim, ovisno o normalnosti raspodjele, koriste se parametrijski (Studentov t-test, ANOVA) ili neparametrijski (Mann-Whitney U test, Kruskal-Wallis H test). Multivarijatna statistika koristi se za modeliranje podataka nakon metabolomske analize, gdje se veliki broj varijabli reducira na nekoliko koje objašnjavaju istovremene odnose između njih. U multivarijantnoj statistici primjenjuju se nenadzirane metode, koje daju pregled podataka i grupiranja bez prethodnog znanja o klasama uzoraka, te nadzirane metode koje koriste poznati ishod za izgradnju prediktivnog modela i utvrđivanja razlike između uzoraka, što pomaže u identifikaciji potencijalnih biomarkera (235,237). Zadnji korak u metabolomskim istraživanjima je biološka interpretacija dobivenih rezultata. Koristeći bioinformatičke alate, baze podataka i analize metaboličkih putova, ovaj korak doprinosi boljem razumijevanju promjena bioloških putova i njihove povezanosti s određenim poremećajima i stanjima (235).

1.3.3. Analitičke platforme i tehnike u metabolomici

Svi koraci metabolomske analize uključujući razdvajanje, detekciju i identifikaciju metabolita, zahtijevaju visokoprotočne analitičke platforme poput MS-a ili NMR-a (Tablica 1.). Analiza tehnikom NMR ne zahtjeva dodatne separacijske tehnike dok detekciji MS-om prethodi separacija. U metabolomici najčešće korištene tehnike za razdvajanje pojedinih metabolita u uzorcima su LC, GC i CE. U slučaju detekcije

metabolita MS-om, najčešće korištene ionizacijske tehnike su elektronska ionizacija (EI), ionizacija elektroraspršenjem (ESI), desorpcijska ESI (DESI), ekstraktivna ESI (EESI), kemijska ionizacija (CI), kemijska ionizacija pri atmosferskom tlaku (APCI), matriks-asistirana laserska desorpcija/ionizacija (MALDI) te površinski asistirana laserska desorpcija/ionizacija (SALDI). U slučaju metabolomskih istraživanja, rjeđe se kao tehnike detekcije koriste UV-Vis detekcija i fluorescentna detekcija. NMR i MS predstavljaju osnovne analitičke strategije u metabolomskim istraživanjima. Odabir određene tehnike ovisi o vrsti matrice uzorka, koncentraciji i kemijskim svojstvima metabolita, kao i o količini dostupnog uzorka. Svaka od detekcijskih metoda ima svoje prednosti i nedostatke, a radi pokrivanja većeg spektra metabolita, metode je moguće i kombinirati.

Tablica 1. Razlike između analitičkih platformi i detekcijskih metoda koje se najčešće koriste u metabolomici.

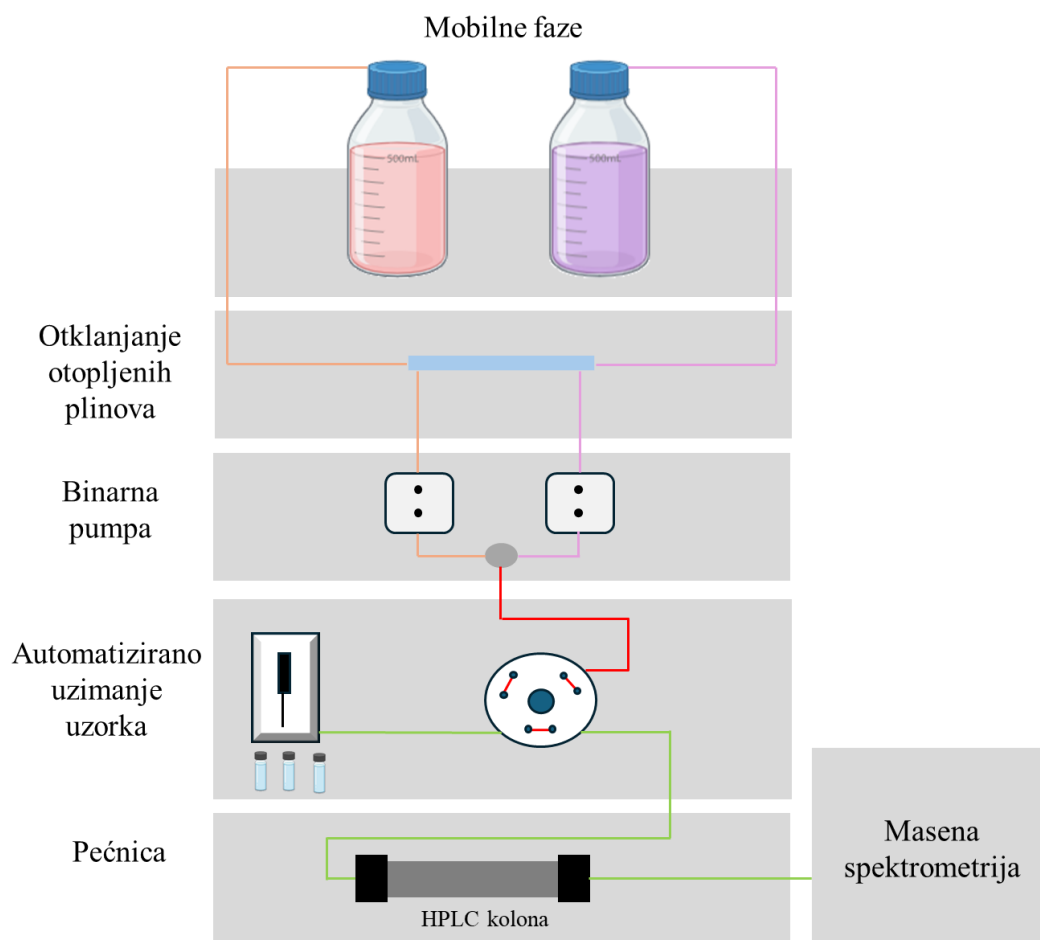
ANALITIČKE TEHNIKE			
	NMR	MS	
Mehanizam detekcije	Magnetska svojstva atomske jezgre	Omjer mase i naboja (m/z)	
		LC	GC
Priprema uzoraka	Jednostavna	Jednostavna	Složena
Reproducibilnost	+	-	+
Osjetljivost	-	+	+
Detekcija	Polarni i nepolarni	Širok spektar (HILIC i RPLC)	Termostabilni i hlapljivi spojevi

1.3.3.1. Tehnike razdvajanja u metabolomici

Najčešće tehnike koje se koriste za razdvajanje spojeva u analiziranim uzorcima su LC i GC dok se CE rjeđe koristi. Kromatografija je važna biofizička tehnika koja omogućava razdvajanje, identifikaciju i pročišćivanje smjese u svrhu kvalitativne i kvantitativne analize. Temelji se na načelu prema kojem se molekule u smjesi, nanosene na stacionarnu fazu (stabilnu fazu), međusobno razdvajaju tijekom kretanja uz pomoć pokretne faze (238). Na proces razdvajanja utječu molekularna svojstva povezana s adsorpcijom, raspodjelom, afinitetom prema fazama ili razlikama u molekularnim masa (239). Zbog tih razlika, komponente smjese se različitim brzinama kreću kroz separacijski sustav. LC je je tehnika razdvajanja u kojoj je pokretna faza tekućina, dok stacionarna faza može biti kruta ili tekuća (Slika 11.). Ova se tehnika najčešće koristi za razdvajanje termolabilnih i nehlapljivih spojeva. Postoji više vrsta LC-a, poput tekućinske

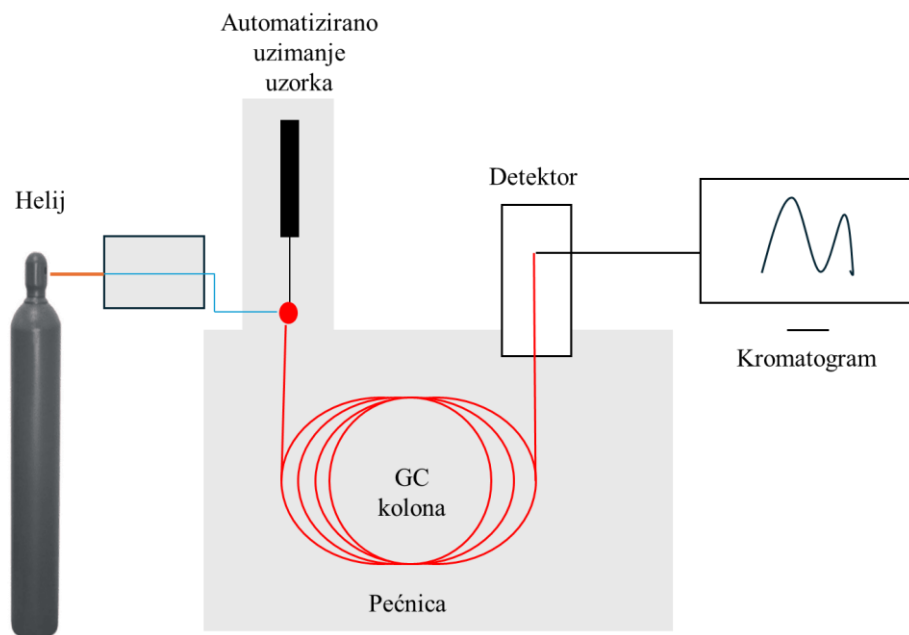
kromatografije normalne faze (engl. *normal phase LC*, NPLC), tekućinske kromatografije obrnutih faza (engl. *reverse phase LC*, RPLC), ionsko-izmjenjivačke kromatografije (engl. *ion exchange chromatography*, IELC), kromatografije isključenjem po veličini (engl. *size exclusion chromatography*, SEC) i kromatografije s hidrofilnom interakcijom (*hydrophilic interaction LC*, HILIC). RPLC je najčešće korištena verzija LC-a, prikladna za razdvajanje nepolarnih i polarnih spojeva, a lako se može spojiti s MS-om. U RPLC-u je stacionarna faza manje polarna od mobilne faze, a interakcija između analita i stacionarne faze ima pretežno hidrofoban karakter (240). Najčešće korištena stacionarna faza je silika gel koji sadrži ili 18 ili 8 ugljikovih atoma (C18 ili C8). S obzirom na to da lipofilniji spojevi imaju jaču interakciju sa stacionarnom fazom, RPLC se često koristi za razdvajanje polu-polarnih spojeva poput fenolnih kiselina i flavonoida te nepolarnih spojeva, poput lipida (241). Suprotno tome, HILIC koristi hidrofilnu stacionarnu fazu pa je prikladnija za razdvajanje polarnih spojeva, poput aminokiselina, karboksilnih kiselina, nukleotida, šećera i vitamina (226).

Mobilne faze mogu se odabrati iz širokog raspona otapala, uključujući vodu, metanol, acetonitril, izopropanol, aceton, n-heksan i druga. Glavni parametri pri odabiru otapala su polarnost, miješanje s drugim otapalima, niska viskoznost, visoka točka vrenja, niska apsorpcija UV zračenja i niska toksičnost (240).



Slika 11. Shematski prikaz osnovnih dijelova tekućinske kromatografije. Preuzeto i prilagođeno prema (242).

GC je metoda za razdvajanje spojeva u kojoj je mobilna faza plin, dok je stacionarna faza kruta ili tekuća (243). Glavna komponenta GC sustava je kapilarna kolona, unutar koje se nalazi tekuća stacionarna faza koja veže i zadržava komponente uzorka (Slika 12.). GC se koristi za razdvajanje termostabilnih i hlapljivih spojeva, čime se nadopunjuje primjena LC-ja koji je prikladniji za nehlapljive analite. Najčešći korišteni plinovi za mobilnu fazu su helij, vodik, dušik i argon, pri čemu je helij najčešći odabir zbog svoje inertnosti, stabilnog protoka i učinkovite separacije.



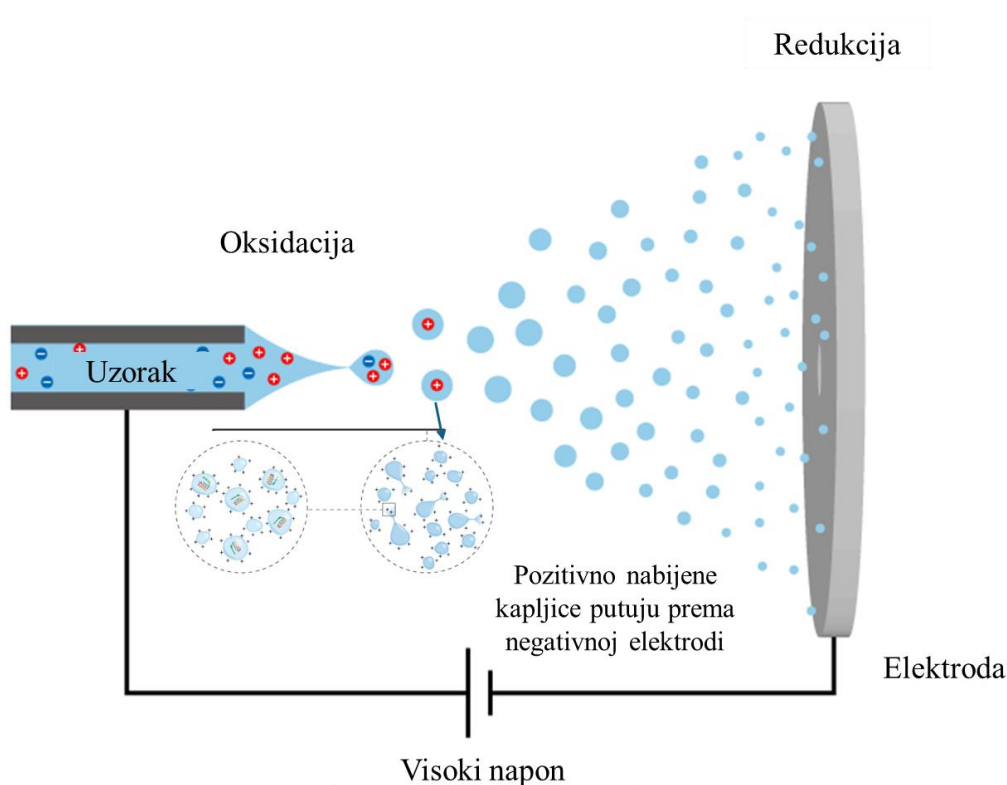
Slika 12. Shematski prikaz osnovnih dijelova plinske kromatografije. Preuzeto i prilagođeno prema (244).

Elektroforetske tehnike posebno su prikladne za razdvajanje polarnih i nabijenih spojeva. Jedna od takvih metoda je CE, kod koje se razdvajanje analita odvija pod istodobnim djelovanjem elektroforetske i elektroosmotske sile unutar kapilare (240). CE se odlikuje visokom rezolucijom razdvajanja, koja ovisi o primijenjenom električnom naponu i elektroforetskoj pokretljivosti iona (245). Zahvaljujući visokoj učinkovitosti i kratkom vremenu analize, CE se počinje koristiti češće kao komplementarna metoda LC-ju i GC-ju. Međutim, CE u metabolomici i dalje ima nekoliko ključnih nedostataka koji su prvenstveno vezani uz osjetljivost, ponovljivost i robusnost same metode u usporedbi s drugim tehnikama.

1.3.3.2. Ionizacijske tehnike u metabolomici

Najčešće korištena ionizacijska tehnika je ESI, koja se temelji na stvaranju iona analita pomoću elektrospreja primjenom visokog napona na otopinu uzorka. ESI se smatra blagim oblikom ionizacije, budući da ne uzrokuje značajnu fragmentaciju analita (Slika 13.) (246). Proces ionizacije se može podijeliti u tri koraka: formiranje kapljica, desolvacija (isparavanje otapala) i prijelaz iona u plinovitu fazu (Slika 13.) (247). Djelovanjem visokog električnog napona, uzorak koji je u tekućem obliku raspršuje se u obliku finih, nabijenih kapljica. Potom te kapljice ulaze u komoru gdje se otapalo isparava djelovanjem protustrujnog zagrijanog plina (najčešće dušika), čime se povećava gustoća

naboja i uzrokuje fragmentacija na manje nabijene kapljice. Konačno, veličina nabijenih kapljica se smanjuje na nanometarsku razinu, a ioni unutar kapljice prelaze u plinovitu fazu i postaju prikladni za analizu MS-om. ESI ima niz prednosti, ali i određene nedostatke. Prednosti uključuju visoku osjetljivost i mogućnost ionizacije nehlapljivih spojeva, a može se koristiti za detekciju anorganskih spojeva, organometalnih ionskih kompleksa i biomakromolekula. Također, može se kombinirati s različitim kromatografskim tehnikama te se može koristiti u pozitivnom i negativnom načinu ionizacije. Glavni nedostaci ESI-ja uključuju ograničen izbor otapala, osjetljivost na parametre otopine i tehničke uvjete te fluktuacije ionskog signala (248).



Slika 13. Princip rada ionizacije elektroraspršenjem (ESI).

Djelovanjem visokog napona iz konusa se emitira mlaz tekućih kapljica (uzorak). Kako otopina u kapljicama isparava, kapljice postaju sve više nabijene i raspadaju se pri čemu nastaje mlaz pozitivno nabijenih iona. Preuzeto i prilagođeno prema (249).

APCI je također blagi oblik ionizacije pri kojem uz atmosferski tlak dolazi do kemijske ionizacije, odnosno, stvaranja stabilnih molekulskih iona u plinovitoj fazi pri atmosferskom tlaku (250). Ovu tehniku karakterizira visoka selektivnost, osjetljivost i širok raspon ionizacije. Za razliku od ESI-ja, koji zahtjeva da analiti imaju površinsku

aktivnost, APCI se ne oslanja na te karakteristike pa je prikladniji za analizu nepolarnih i umjereno polarnih spojeva. Glavni nedostaci su ograničena primjena za biomakromolekule, zbog nedostatka informacija o strukturi i slabog stvaranja fragmentnih iona (251).

MALDI je ionizacijska tehnika koja se temelji na stvaranju iona pomoću energije lasera. Koristi se za analizu proteina, peptida, nukleinskih kiselina i polimera (252). Princip MALDI tehnike temelji se na primjeni visokointenzivne pulsne energije lasera na analit u vrlo kratkom vremenskom intervalu, što uzrokuje desorpciju i ionizaciju. Glavne prednosti MALDI tehnike su jednostavna priprema uzorka, ionizacija biomolekula te kompatibilnost s različitim detekcijskim metodama (252).

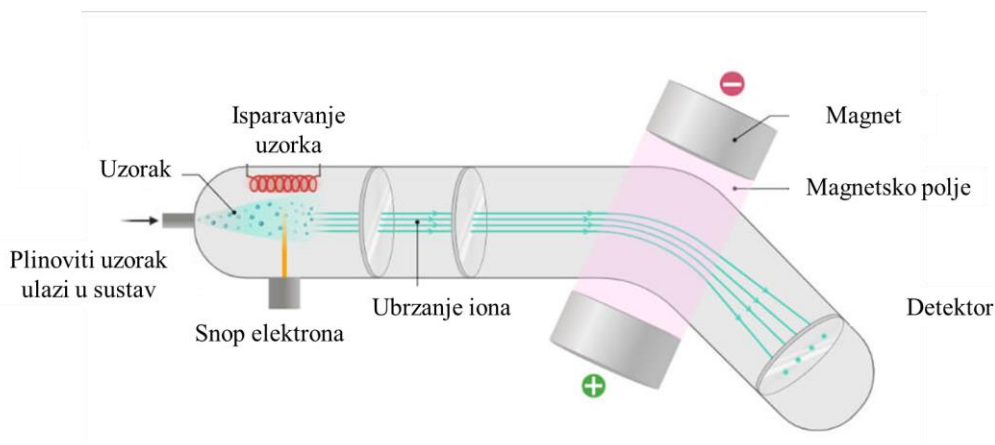
El jedna je od najstarijih ionizacijskih tehnika u MS-u (253). El se smatra „tvrdom“ tehnikom ionizacije, jer koristi visokoenergetske elektrone za stvaranje iona, što dovodi do opsežne fragmentacije i olakšava definiranje strukture nepoznatih spojeva. Prednosti ove metode su nespecifičnost, osjetljivost i visoka učinkovitost ionizacije, a dobiveni spektar sadrži karakterističan uzorak fragmentacije koji se smatra „otiskom prsta“ svakog pojedinog spoja koji se analizira (254). Glavni nedostaci su što nije prikladan za toplinski osjetljive spojeve i što omogućava nastanak samo pozitivno nabijenih fragmenata. Ova metoda se najčešće kombinira s GC-MS sustavom za detekciju hlapljivih i termostabilnih spojeva manje molekulske mase (255).

1.3.3.3. Masena spektrometrija u metabolomici

MS predstavlja analitičku platformu visokog protoka, koja se odlikuje visokom selektivnošću i osjetljivošću (Slika 14.). Omogućuje dobivanje specifičnih kemijskih informacija, poput točne mase, izotopne distribucije i karakterističnog uzorka fragmentiranih iona, što pridonosi određivanju i identifikaciji strukture metabolita te njihove kemijske formule (256). MS je kvalitativna i kvantitativna analiza te je najčešće korištena analitička tehnika u metabolomici. MS se sastoji od četiri osnovna dijela: sustava za uvođenje uzorka, izvora ionizacije, analizatora masa i detektora iona (257). MS omogućuje detekciju analita vrlo niskih koncentracija, čak do pikomolarnog i atomolarnog raspona (258). Za razliku od NMR-a, detektabilnost metabolita u MS-u ovisi o učinkovitosti ionizacije, koja je određena sastavom uzorka. Prednost MS-a je i u tome što je za analizu potreban vrlo mali volumen uzorka, dok NMR zahtjeva minimalno od 30 do 600 µl (256). MS ima višu rezoluciju od NMR-a, iako mu je dinamički raspon manji. Za složene matrikse, poput bioloških tekućina, razdvajanje analita prije ulaska u analizator masa ima ključnu ulogu. Stoga se MS često spaja s metodama razdvajanja smjesa, poput LC-a i GC-a, što je kod NMR-a manje uobičajeno (256). Iako se u metabolomici često

koristi pojedinačna analitička tehnika, kombinacija MS-a i NMR-a može znatno poboljšati identifikaciju novih biomarkera. Najčešće korišteni izvori ionizacije u LC-MS analizi je ESI, dok se GC-MS najčešće oslanja na EI. U slučaju LC-MS analize, u izvoru ionizacije dolazi do pretvaranja analita u ione plinovite faze. Nakon ionizacije, ioni se razdvajaju prema njihovom omjeru mase i naboja (m/z) u analizatoru masa, dok se detektirani ioni zajedno s njihovim intenzitetom i m/z vrijednošću bilježe i pohranjuju u sustav. U analizi metabolita koriste se različiti tipovi analizatora masa, uključujući kvadrupol (Q), *time-of-flight* (TOF), ionsku zamku (IT), orbitrap i Fourierovu ionsku ciklotronsku rezonancu (FT-ICR) (257). Kvadrupol je najčešće korišten analizator, pogotovo u kombinaciji s GC-em, zbog jednostavnosti, pristupačne cijene i dugog vijeka trajanja. Sastoji se od četiri paralelne elektrode koje stvaraju električno polje i filtriraju ione prema njihovom m/z omjeru. Ionska zamka predstavlja modifikaciju kvadrupola (259), a 3D ionske zamke sastoje se od hiperboličnog prstena smještenog između dviju elektrodnih ploča. Ovisno o primijenjenoj frekvenciji i istosmjernom naponu, ioni određenog m/z zadržavaju se unutar zamke, dok se ostali filtriraju (259). TOF analizator temelji se na kinetičkoj energiji i vremenu leta iona. Sastoji se od cijevi za let i mreže za ubrzavanje, pri čemu su svi ioni ubrzani jednakom energijom, ali lakši ioni dolaze brže do detektora (257). FT-ICR analizator određuje m/z omjer pomoću ciklotronske frekvencije iona unutar magnetskog polja. Iako nudi visoku točnost i rezoluciju, zahtijeva jaka magnetska polja i helij za hlađenje, što povećava troškove održavanja (257). Orbitrap, za razliku od FT-ICR-a, koristi električno polje za oscilaciju iona između vanjske i unutrašnje elektrode. Zbog visoke rezolucije, jednostavnosti i nižih troškova, Orbitrap se vrlo često primjenjuje u metabolomskim istraživanjima (260).

MS uređaji često sadrže dva analizatora masa, čime se omogućuje tandemaska analiza (MS/MS) (256). U prvom analizatoru dolazi do odabira iona prema m/z vrijednosti, koji se zatim usmjeravaju u kolizijsku ćeliju te se fragmentiraju (*collision induced dissociation*, CID). Nastali produkti ioni analiziraju se u drugom analizatoru. Najčešće korišten MS/MS instrument za kvantifikaciju je trostruki kvadrupol (QqQ). Prvi kvadrupol detektira prekursorske ione nastale ionizacijom, drugi kvadrupol predstavlja kolizijsku ćeliju koja omogućuje njihovu fragmentaciju, dok treći detektira specifične produktne ione (257). U ne ciljanim metabolomskim istraživanjima često se kvadrupolni analizator masa kombinira s TOF analizatorom, pri čemu nastaje hibridni Q-TOF sustav. Nakon što kvadrupol filtrira ione prema njihovom m/z omjeru, oni se ubrizgavaju u TOF analizator. Ovakav sustav osigurava brzo skeniranje, visoku točnost detektiranih masa i visoku rezoluciju (257). Kombinacija MS-a s različitim tehnikama razdvajanja te spajanje s različitim analizatorima masa omogućuje dobivanje velike količine strukturnih, kemijskih i bioloških informacija u metabolomskim istraživanjima.



Slika 14. Princip rada masene spektrometrije.

Molekule se bombardiraju snopom elektrona, što dovodi do njihovog ioniziranja i fragmentacije. Svaka vrsta iona ima specifičan omjer mase i naboja (m/z), a budući da većina iona nosi jedan naboj, omjer m/z odgovara molekulskoj masi iona. Ioni zatim prolaze kroz magnetsko i električno polje prema detektoru, gdje se bilježi maseni spektar. Preuzeto i prilagođeno prema (261).

1.3.3.3.1. Tekućinska kromatografija spregnuta sa spektrometrijom masa

LC-MS (Slika 15.) je analitička tehnika koja kombinira LC kao metodu razdvajanja te MS za detekciju i identifikaciju spojeva. Zbog svojih kvalitativnih i kvantitativnih mogućnosti, kao i robusnosti, LC-MS se primjenjuje u brojnim područjima, uključujući farmaceutsku, biofarmaceutsku, forenzičku, prehrambenu industriju te aktivnosti vezane uz zaštitu okoliša (262). U kliničkim istraživanjima, LC-MS se rutinski koristi za analizu lijekova, vitamina i minerala u punoj krvi, plazmi, serumu i urinu (237). Također je našla široku primjenu u metabolomskim, proteomskim i genomskim istraživanjima. LC-MS metoda se koristi za detekciju raznih spojeva, uključujući termolabilne i hlapljive polarne i nepolarne spojeve uz visoku osjetljivost i selektivnost. Ovisno o vrsti uzorka, mogu se primijeniti dvije vrste LC-MS sustava: HILIC-MS i RPLC-MS. HILIC-MS se koristi za detekciju visoko polarnih spojeva, poput šećera, vitamina, aminokiselina, nukleotida i karboksilnih kiselina, dok se RPLC-MS primjenjuje uglavnom za nepolarne spojeve, poput fenolnih kiselina, flavonoida, glikoziliranih steroida, alkaloida i drugih glikoliziranih spojeva. RPLC-MS se smatra zlatnim standardom u metabolomici zbog svoje osjetljivosti i široke primjene (263). Sustavi LC-a i MS-a povezani su sučeljem koje ujedno predstavlja izvor ionizacije. Najčešće korištene vrste ionizacije su ESI i APCI (262). Zbog raznolikih kemijskih svojstava metabolita, analize se često provode u pozitivnom i negativnom ionizacijskom načinu, unutar raspona skeniranja 50-1000 m/z , čime se osigurava

maksimalna pokrivenost metabolita u uzorku (264). ESI je najčešće korišten oblik ionizacije u metabolomskim istraživanjima. Riječ je o blagom obliku ionizacije gdje dolazi do stvaranja intaktnih molekularnih iona, bez značajne fragmentacije, što olakšava identifikaciju. APCI također ne izaziva fragmentaciju i često služi kao dopuna pri analizi nepolarnih i termički stabilnih spojevima, poput lipida (264). Zbog tih svojstava, LC-ESI-MS se smatra metodom izbora za profiliranje metabolita iz složenih bioloških uzoraka (265).

Više čimbenika doprinosi varijabilnosti LC-MS podataka. Osim biološke varijabilnosti, podaci mogu pokazivati varijabilnost iz analitičkih razloga, uzrokovanu pripremom uzoraka, stanjem instrumenta i/ili radnim uvjetima (264). Takve varijacije mogu se očitovati kao pomak vremena zadržavanja u koloni, kao promjene u vrijednostima intenziteta ili pomak u m/z vrijednostima. Varijacije se mogu pojaviti i u MS/MS spektrima, osobito kada su podaci generirani različitim tipovima instrumenata ili pod različitim eksperimentalnim uvjetima. Zbog različitih kombinacija izvora ionizacije, energije sudara, masenog analizatora i detektora, isti metabolit može rezultirati različitim MS/MS spektrima. Relativno slaba reproduktivnost MS/MS spektara predstavlja glavni problem pri identifikaciji metabolita usporedbom spektara s bazama podataka. Prednost LC-MS analize u odnosu na GC-MS je u tome što se analize provode pri nižim temperaturama, čime se omogućuje analiza toplinski osjetljivih metabolita koji se metodom GC-MS ne mogu detektirati. Osim toga, nije potrebna kemijska derivatizacija, što znatno pojednostavljuje pripremu uzoraka i identifikaciju metabolita. Primjena blagih metoda ionizacije olakšava strukturnu karakterizaciju spojeva. Druge prednosti LC-MS metode uključuju smanjenu ionsku supresiju, bolje razdvajanje izomera, poboljšanu detekciju te višu kvaliteta MS podataka zahvaljujući nižoj razini pozadinske buke (227). Jedan od čimbenika koji mogu utjecati na robusnost metode jest kontaminacija izvora masenog spektrometra i stvaranje adukata. Kako bi se postigla točna identifikacija, važno je prepoznati nastale artefakte prije normalizacije podataka. Još jedan značajan nedostatak LC-MS profiliranja u odnosu na GC-MS profiliranje jest ograničena dostupnost masenih spektara u online dostupnim bazama podataka koji bi olakšali identifikaciju metabolita. Spektri masa dobiveni na različitim LC-MS sustavima se znatno mogu razlikovati u relativnom intenzitetu iona, stvaranju adukata, fragmentaciji u izvoru i MS/MS fragmentima (266). Zbog toga istraživačke skupine izrađuju vlastite, interne baze podataka, prilagođene specifičnostima instrumenata. Ipak, otvorene i zajedničke baze koje sadrže stručno provjerene spektre imaju veći značaj jer predstavljaju važan korak prema pouzdanijoj i automatiziranoj identifikaciji metabolita (267,268). Razvoj novih LC tehnologija, poput visokotlačne (HPLC) i ultravisokotlačne (UHPLC) tekućinske kromatografije, predstavljaju značajan napredak u analitičkoj kemiji. Primjenom višeg

tlaka i povećanjem brzine protoka, ove metode omogućuju bolju kromatografsku rezoluciju i veću učinkovitost razdvajanja u složenim uzorcima (269).



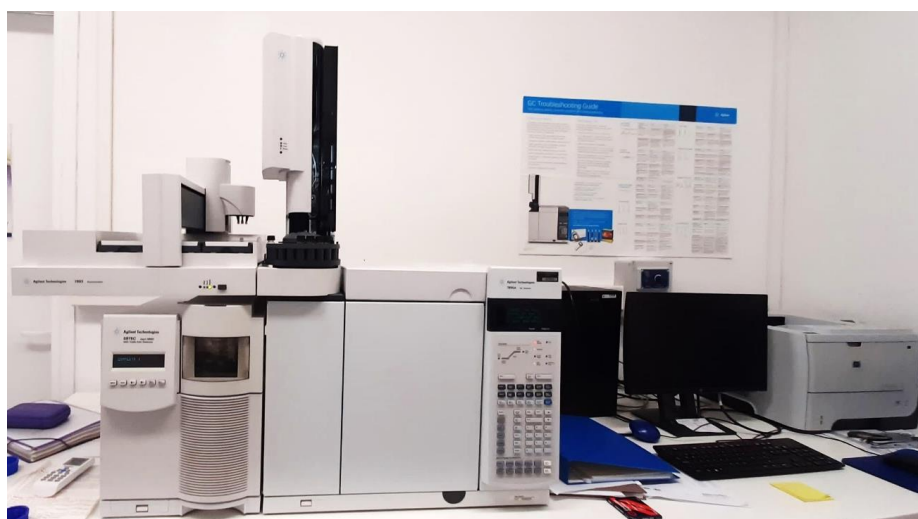
Slika 15. LC uređaj 1290 infinity II (Agilent Technologies) spojen na detektor Agilent 6550 iFunnel Q-TOF koji se nalazi u metabolomskoj jedinici na Institutu Ruđer Bošković.

1.3.3.3.2. Plinska kromatografija spregnuta masenim spektrometrom

GC-MS (Slika 16.) predstavlja jednu od najučinkovitijih platformi korištenih u metabolomskim istraživanjima zbog svoje robusnosti, učinkovitosti u razdvajanju, osjetljivosti i dobre reproducibilnosti (235,270). U usporedbi s metodom LC-MS, GC-MS je manje podložan uobičajenim problemima poput matriks efekta i ionske supresije uzrokovane koeluirajućim spojevima (235). Ova metoda obično postiže veću kromatografsku rezoluciju, ali se može koristiti samo za detekciju i identifikaciju termostabilnih i hlapljivih spojeva manje molekulske mase (50-600 Da) (271,272). Za detekciju polarnih i nehlapljivih metabolita metodom GC-MS, potrebno je provesti kemijsku derivatizaciju, što može predstavljati izazov, osobito u neciljanim metabolomskim istraživanjima (273). Naime, umjesto stvarnog spoja, mjere se njegovi derivati, što otežava strukturnu karakterizaciju spoja. Osim toga, višak reagensa dodan za postizanje derivatizacije, često može prekriti signale drugih spojeva. Dodatni nedostatak metode jest to što broj metabolita u uzorku premašuje detekcijski kapacitet uređaja, što dovodi do grupiranja metabolita unutar vrlo uskog vremenskog intervala. Jedan od načina za povećanje razdvajanja metabolita je primjena dvodimenzionalne plinske kromatografije (2D-GC ili GCxGC), čime se povećava kapacitet pikova i moć razdvajanja (266).

GC-MS sustav koristi različite metode ionizacije, uključujući EI, CI i APCI. EI, kao „tvrđi“ oblik ionizacije, koristi energiju od 70 eV, što rezultira ponovljivom fragmentacijom molekula u dobro karakterizirane masene spektre (273). Takvi spektri omogućuju usporedbu podataka dobivenih instrumentima različitih proizvođača i s različitim tipovima analizatora. Ova značajka, uz široku dostupnost baza podataka i knjižnica masenih spektara koje nude različiti proizvođači, te javno dostupne baze poput NIST ili MassBank, doprinijela je tome da je EI najčešće korištena metoda ionizacije u GC-MS metabolomskim istraživanjima (274). Glavni nedostatak ovog tipa ionizacije je mogućnost pojave lažno pozitivnih identifikacija prilikom pretraživanja baza podataka. S druge strane, CI, kao „blagi“ oblik ionizacije, ne proizvodi izrazito karakteristične obrasce fragmentacije, ali omogućuje detekciju molekularnih iona. Zbog toga je njezina primjena sve učestalija, osobito u ciljanjoj metabolomici.

GC-MS sustav može sadržavati različite analizatore, a najčešće se kombinira s jednim kvadrupolom što rezultira dobrim dinamičkim rasponom i visokom osjetljivošću (275). Kombinacija GC tehnike s trostrukim kvadrupolom, smanjuje probleme povezane s identifikacijom i kvantifikacijom koeluiranih metabolita. Ipak, GC u kombinaciji s kvadrupolom pokazuje nižu točnost mase u usporedbi s TOF analizatorom (275). GC-TOF-MS tehnologija karakterizira se visokom točnošću masa, visokom rezolucijom i brzinom skeniranjem. GC-MS u kombinaciji s jakom elektronskom ionizacijom predstavlja zlatni standard u metabolomskim istraživanjima, osobito u područjima medicine, biljnih znanosti, prehrambenih znanosti, znanosti o okolišu, istraživanjima lijekova te biotehnologiji (271).



Slika 16. GC uređaj Agilent 7890A spojen s masenim spektrometrom Agilent Technologies 5975 s jednostrukim kvadrupolom, smješten u metabolomskoj jedinici na Institutu Ruđer Bošković.

1.3.4. Primjena metabolomike u biomedicinskim istraživanjima

Dva glavna cilja u metabolomskim istraživanjima su razotkrivanje i bolje razumijevanje mehanizama određenih poremećaja ili mogućih terapijskih pristupa te otkrivanje i identifikacija potencijalnih prediktivnih, prognostičkih ili dijagnostičkih biomarkera. Pregledom literaturi vidljiv je potencijal metabolomike u istraživanjima različitih humanih poremećaja i bolesti, uključujući tumore, metaboličke i kardiovaskularnih bolesti, neurodegenerativne bolesti i ostalo.

Poremećaji uzrokovani promjenama u metabolizmu šećera i lipida, uključujući pretilost, dijabetes i kardiovaskularne bolesti, postali su vodeći globalni zdravstveni problemi, osobito u razvijenima zemljama. Pretilost kao jedna od globalnih pandemija, povezana je s metaboličkim sindromom, dijabetesom tipa 2 i rizikom za razvoj kardiovaskularnih bolesti (276). Metabolomskim istraživanjima otkriveni su obrasci promijenjenih metabolita koji razlikuju pretilu od nepretilih osoba. Primjerice, u pretilih osoba zabilježeno je nakupljanje aminokiselina razgranatog lanca (BCAA) u krvi, što može biti jedan od ranih pokazatelja metaboličkog sindroma (277). Nadalje, metabolomska istraživanja otkrila su nekoliko promijenjenih metabolita prisutnih u pacijenata s dijabetesom u odnosu na zdrave kontrole. Primjerice, BCAA aminokiseline i aromatske aminokiseline, poput fenilalanina i tirozina, mogu predvidjeti razvoj inzulinske rezistencije i dijabetesa tipa 2 (278). U velikom istraživanju koje je uključilo više od 2000 sudionika, pokazano je da se određeni tip prehrane može povezati s metabolomskim profilom koji je povezan s većim rizikom za razvoj dijabetesa tipa 2. Taj profil je uključivao povišene razine heksoze i diacil-fosfatidilkolina te snižene razine acil-, alkil- i lizofosfatidilkolina i sfingomijelina (279). NMR istraživanjima otkriveni su različiti rizični čimbenici za kardiovaskularne bolesti, poput povišenih triglicerida, LDL-a i HDL-a (280). Također su identificirani novi metabolički markeri, uključujući 3-hidroksibutirat, α -ketoglutarat i treonin, dok su metabolički putevi povezani s visokim kardiovaskularnim rizikom bili usmjereni na LDL, treonin i acetoacetat. Integracija metabolomskih i proteomskih studija doprinijela je boljem razumijevanju metaboličke regulacije staničnih procesa u vezi s kardiovaskularnim bolestima (281).

Rak ima brojne učinke na metabolizam koji uključuju preusmjeravanje unutarnjih staničnih putova kako bi se osigurala proliferacija i rast tumorskog tkiva (282). Stoga, primjena metabolomike ima veliki potencijal u pronalasku i identifikiranju biomarkera te

pokretača tumorigeneze. Jedan od najznačajnijih doprinosa u području precizne medicine jest korištenje metabolomike za klasifikaciju tumora radi dizajniranja personalizirane terapije (283). Osim navedenog, primjena masene spektrometrije može pomoći u klasifikaciji tipova tkiva tumora prema njihovim molekularnim obrascima (283). Primjerice, acilkarnitini povezani su s ranim stadijima različitih karcinoma. Panel acilkarnitina koji uključuje C16:1, C18:3, C18:2, C18:1, C20:4 i C22:6 pokazao je izvrsnu dijagnostičku sposobnost u razlikovanje naprednog raka gušterače od zdravih kontrola i pankreatitisa (284). Također, isti panel acilkarnitina može razlikovati i rani stadij raka dojke od zdravih kontrola (285). Lipidni metabolizam se ističe kao važan čimbenik u modulaciji upale, širenju mijeloidnih stanica i reprogramiranju upalnih fenotipova (286). Ipak, mnogi mehanizmi tumorigeneze nisu u potpunosti razjašnjeni, stoga je potrebno detaljnije istražiti kako metaboliti međusobno djeluju i utječu na progresiju tumora. Integracija metabolomike s drugim *omics* pristupima omogućuje bolje razumijevanje razvoja, progresije, učinkovitosti terapije i remisije raka (276).

Neurodegenerativne bolesti, poput AB-a ili Parkinsonove bolesti, obično se dijagnosticiraju nakon pojave simptoma. Međutim, danas znamo da neurodegenerativni procesi započinju mnogo ranije, pretpostavlja se i desetljećima prije pojave prvih kliničkih znakova. Stoga postoji velika potreba za razvojem neinvazivnih dijagnostičkih metoda za rano otkrivanje ovih patologija. Metabolomika predstavlja vrlo dobar alat za identifikaciju suptilnih kemijskih promjena povezanih s napredovanjem neurodegenerativnih bolesti. Kod AB-a zabilježene su promjene u razinama različitih lipidnih metabolita, kako u ljudskim uzorcima, tako i u animalnim modelima, koji su povezani s oksidativnim stresom, disfunkcijom mitohondrija i energetskeg metabolizmom (287). Metabolomskim analizama utvrđene su promjene u razinama masnih kiselina, aminokiselina, glicerofosfolipida, ugljikohidrata, nukleotida, karnitina i organskih kiselina koje su dio različitih metaboličkih putova, u raznim neurodegenerativnim i psihijatrijskim poremećajima (287–289). Kod AB-a, izvanstanične nakupine peptida A β , prisutnost fosforiliranog proteina tau i povišene razine lakog lanca neurofilamenta u CSF-u, povezane su s kasnijim stadijima bolesti (290). Razine određenih metabolita u plazmi, poput amina, aminokiselina i acilkarnitina, pozitivno koreliraju s razinama lakog lanca neurofilamenta, što ukazuje na poremećaje u putu dušikovog oksida, regulaciji neurotransmitera i mitohondrijskoj funkciji. Smanjeni metabolizam glukoze u mozgu također je povezan s razinama glavnih markera neurodegeneracije (291). Za analizu neurodegenerativnih i psihijatrijskih poremećaja, uzorci CSF-a predstavljaju najbolji izbor za najvjerodostojnije praćenje promjena koje se događaju u mozgu. Međutim, zbog invazivnog načina uzorkovanja, krv se najčešće koristi kao sredstvo istraživanja. U serumu pacijenata oboljelih od AB-a zabilježeno je smanjenje razine oleamida te povećanje razine prostalglandina i diacilglicerola, što bi moglo biti

povezano s promjenama u neurotransmitterskom sustavu i strukturi stanične membrane (292). Iako je etiologija većine neurodegenerativnih bolesti još uvijek nejasna, metabolomske analize mogu doprinijeti boljem razumijevanju patogeneze i progresije bolesti. Očekuje se da će u bliskoj budućnosti detaljnije karakterizirane promjene u razinama različitih lipidnih vrsta i aminokiselina omogućiti identifikaciju biomarkera koji bi mogli ukazivati na rizik od razvoja bolesti ili ranu fazu neurodegeneracije (293).

2. HIPOTEZA I CILJEVI

Neciljana metabolomska analiza omogućuje detekciju i identifikaciju velikog broja metabolita te sveobuhvatno metabolomsko profiliranje. Ovakav pristup omogućuje usporedbu metaboličkih promjena uočenih kod ljudskih ispitanika oboljelih od AB-a s onima prisutnima u animalnim modelima bolesti, čime se doprinosi boljem razumijevanju patofizioloških mehanizama AB-a. Nadalje, integracija podataka o perifernim metaboličkim promjenama s promjenama koje se odvijaju u središnjem živčanom sustavu omogućuje identifikaciju potencijalnih poveznica između sistemskih i neuroloških aspekata bolesti. Usmjeravanje terapijskih strategija prema metaboličkim putovima zahvaćenima AB-om predstavlja obećavajući pristup koji bi mogao nadmašiti učinkovitost trenutno dostupnih lijekova. U tom kontekstu, istraživanje djelovanja neurosteroida DHEAS na mišjem modelu AB-a može dati odgovore o metaboličkim putevima neurodegeneracije i potencijalnog terapijskog učinka ovog neurosteroida.

Hipoteza istraživanja:

1. Razine pojedinih metabolita će biti promijenjene (snižene ili povišene) kod ispitanika oboljelih od AB-a u odnosu na ispitanike s MCI-jem i kontrolne ispitanike. Također se očekuju razlike u razinama metabolita između MCI ispitanika i zdravih kontrola.
2. Promjene u razinama metabolita te njihovim metaboličkim putovima bit će povezane s patogeneza AB-a.
3. Značajno promijenjeni metaboliti u ispitanika oboljelih od AB-a u odnosu na MCI i kontrolne ispitanike, kao i kod MCI ispitanika u odnosu na zdrave kontrole mogu predstavljati potencijalne dijagnostičke i prognostičke biomarkere korisne za učinkovitiju dijagnozu AB-a.
4. Tretiranje animalnog modela AB-a neurosteroidom DHEAS uzrokovat će promjene u metaboličkom profilu miševa koji razvijaju AB u odnosu na kontrolne miševe, što može ukazivati na terapijski potencijal ovog spoja.

Ciljevi istraživanja:

Glavni cilj ovog istraživanja je istražiti biokemijske promjene vezane uz patologiju AB-a u svrhu pronalaska lako dostupnih biomarkera bolesti. Njihovo otkriće moglo bi doprinijeti ranijem otkrivanju AB-a i učinkovitijoj terapiji.

Specifični ciljevi:

1. Provesti neciljanu LC-MS i GC-MS metabolomsku analizu na 40 uzoraka plazme ispitanika oboljelih od AB-a, 40 MCI ispitanika te 40 zdravih kontrola, s ciljem određivanja njihovog plazmatskog metabolomskog profila.
2. Provesti neciljanu LC-MS i GC-MS metabolomsku analizu plazme i tkiva prefrontalnog korteksa mozga mišjeg modela AB-a (3xTg-AD).
3. Ispitati učinak neurosteroida DHEAS-a na promjene u metaboličkim putovima u mišjem modelu bolesti.
4. Usporediti metaboličke promjene otkrivene analizom ljudskih i mišjih uzoraka kako bi se dobila šira slika biokemijskih promjena u AB-u.

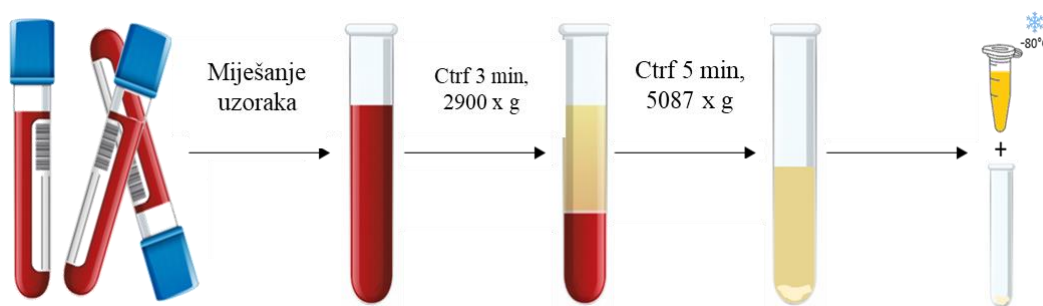
3. MATERIJALI I METODE

3.1. Ljudski ispitanici

U ovo istraživanje uključeno je ukupno 120 ispitanika hrvatskog podrijetla. Ispitanici su podijeljeni u 3 skupine: zdrave kontrole (N = 40), ispitanici s MCI-jem (N = 40) i pacijenti oboljeli od AB-a (N = 40). Svi ispitanici su liječeni u Sveučilišnoj psihijatrijskoj bolnici Vrapče u Zagrebu. Dijagnozu su postavili psihijatri prema NINCDS-ADRDA (Nacionalni institut za neurološke i komunikacijske poremećaje te moždani udar – Asocijacija za Alzheimerovu bolest i srodne poremećaje (294) i DSM-V klasifikaciji (295). Kognitivni simptomi procijenjeni su pomoću testa procjene mentalnog stanja (engl. *Mini-Mental State Examination*, MMSE). MMSE je psihometrijski test koji se koristi za detekciju razine kognitivnog oštećenja. Sastoji se od 11 pitanja i procjenjuje različita područja kognitivnih funkcija: orijentacija, pažnja, razumijevanje, memorija, govor, računanje, čitanje i pisanje. Najveći mogući broj bodova iznosi 30, pri čemu se veći broj bodova povezuje s boljim kognitivnim sposobnostima. Broj bodova od 21 do 24 upućuje na blago, 10 do 20 na umjereno, a 9 ili manje na teško kognitivno oštećenje. Osobe s normalnim kognitivnim funkcijama na ovom testu ostvaruju 25 ili više bodova. Prikupljeni podaci o ispitanicima uključivali su demografske podatke poput dobi, spola, tjelesne težine, indeksa tjelesne mase te kliničke parametre (razine glukoze, kolesterola, LDL-a, HDL-a i triglicerida). Svi ispitanici su potpisali informirani pristanak, a postupci istraživanja detaljno su objašnjeni sudionicima i/ili njihovim skrbnicima. Svi sudionici prošli su neurološki pregled, ispitivanje funkcije štitnjače i serološke testove na Lajmsku bolest i sifilis. Također su određene razine vitamine B12 i B9. Ispitanici nisu bili u srodstvu te nisu uzimali antidementivnu terapiju (inhibitori kolinesteraza i/ili memantin). Iz istraživanja su isključeni ispitanici s vaskularnom ili drugim oblicima demencije, tumorima, upalnim bolestima središnjeg živčanog sustava, sistemskim bolestima (dijabetes, hipertenzija ili pretilost), kao i oni s drugim psihijatrijskim ili neurološkim bolestima (Huntingtonova bolest, frontotemporalna demencija). Također, isključni kriterij za sve ispitanike bio je i prisustvo patofizioloških promjena u jetri. Zdravi ispitanici su prošli cijeli proces testiranja na neuropsihijatrijske poremećaje te su primijenjeni isti isključni kriteriji kao i za ispitanike s AB-om i MCI-jem, uz to da zdravi ispitanici nisu smjeli imati nikakvo kognitivno oštećenje te nisu smjeli biti liječeni nikakvim psihotropnim lijekovima. Istraživanje je odobreno od strane Etičkog odbora Sveučilišne psihijatrijske bolnice Vrapče u Zagrebu (broj odobrenja: 23–605/3–18; 23. ožujka, 2018) i provedena u skladu s Helsinškom deklaracijom (Svjetska medicinska udruga, 2013.).

3.1.1. Obrada uzoraka krvi

Uzorci krvi prikupljeni su između 7.00 i 9.00 ujutro, natašte i kao dio rutinskih posjeta Klinici za psihijatriju „Vrapče“. Ispitanicama je uzeto 8,5 ml krvi u epruvetu koja je sadržavala 1,5 ml antikoagulansa koji sadrži limunsku kiselinu, natrij citrat i dekstrozu. Nakon toga, uzorci krvi su dostavljeni u Laboratorij za molekularnu neuropsihijatriju Instituta Ruđer Bošković, gdje su odmah obrađeni. Kako bi se izdvojila plazma, puna krv je centrifugirana 3 min na 1100 x g te je nakon toga uslijedio drugi korak centrifugiranja u trajanju od 15 min pri 5087 x g radi uklanjanja trombocita. Tako dobivena plazma siromašna trombocitima alikvotirana je i pohranjena na -80 °C do daljnje analize (Slika 17).



Slika 17. Shematski prikaz izdvajanja plazme iz uzoraka krvi.

3.2. Animalni model AB-a *in vivo*

Kao genetički model AB-a korišteni su transgenični miševi 3xTg-AD (Slika 18.). Ovi miševi nose tri ljudske mutacije povezane s obiteljskim oblikom AB-a: APP *Swedish*, MAPT P301L i PSEN1 M146V (160), a razvijeni su na hibridnoj podlozi miševa C57BL/6 i 129SvJ (296). U istraživanje je uključeno ukupno 20 mužjaka 3xTg-AD miševa te 20 kontrolnih miševa 3xTg (+/+), u dobi od 9-10 mjeseci. Ova dob miševa je odabrana jer je pokazano da se taloženje A β kod ovog mišjeg modela pojavljuje u nekim regijama mozga već u dobi od tri do četiri mjeseca, a izvanstanični depoziti peptida A β prisutni su u frontalnom korteksu već u dobi od šest mjeseci i postaju opsežniji do dvanaestog mjeseca starosti (297). Miševi su uzgojeni na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Pečuhu, koji posjeduje licencu za uzgoj, držanje i provođenje pokusa na životinjama. Miševi su bili smješteni u kavezima, u prostoriji s ciklusom svijetla i tame od 12 h svijetla / 12 h tame (svijetlo od 07:00-19:00h), pri sobnoj temperaturi $22 \pm 2^\circ\text{C}$ i relativnoj vlažnosti od $55 \pm 10\%$. Životinje su hranjene standardiziranim peletima te su imale neograničen pristup vodi (*ad*

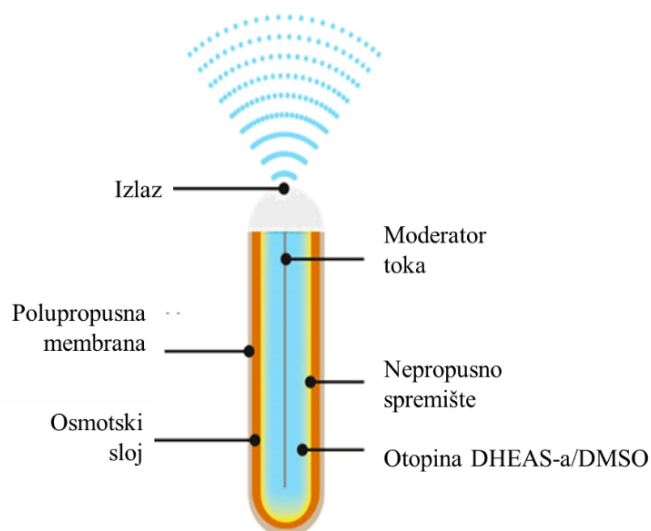
libitum). Svi postupci na životinjama provedeni su u skladu s institucijskim smjernicama usklađenima s Direktivom 2010/63/EU te su odobreni od strane Povjerenstva za dobrobit životinja Sveučilišta u Pečuhu (BA02/2000-84/2022).



Slika 18. 3Tg-AD miš. Preuzeto s <https://www.jax.org/strain/004807>.

3.2.1. Tretman lijekom DHEAS-om

Kontrolnim miševima i 3xTg-AD miševima ugrađene su Alzet® mikro-osmotske pumpice volumena 200 µl (Charles River Laboratories, SAD) (Slika 19.). Ugradnju pumpica provela su dva veterinara, a životinje su bile pod općom anestezijom izofluranom (3-4% za indukciju i 1-3% za održavanje) u indukcijskoj komori (*RWD Induction Chamber V101*) uz korištenje uređaja za anesteziju malih životinja (*R500 Small Animal Anesthesia Machine*, RWD Life Science, Kina). Trideset minuta prije zahvata životinjama je potkožno ubrizgan analgetik buprenorfin u dozi od 0,1 mg/kg. Pumpice su postavljene potkožno i ugrađene u interskapularno područje. Nakon operativnog zahvata životinjama je osigurana postoperativna skrb, koja je uključivala utopljavanje, smještaj u zasebne kaveze te višesatni nadzor nakon buđenja iz anestezije. Neposredno prije ugradnje, u osmotske pumpice dodan je DHEAS otopljen je u 50%-tnom dimetilsulfoksida (DMSO, Sigma-Aldrich, SAD). Brzina otpuštanja lijeka iz pumpice iznosila je 0,15 µl/h, a DHEAS je primjenjivan u dnevnoj dozi od 1mg/kg. Odabrana doza nalazi se unutar preporučenog raspona za primjenu u miševima (298), te je definirana na način da ima dovoljno dobru topljivost i kontinuirano otpuštanje iz osmotskih pumpica. Kontrolne životinje, umjesto DHEAS-a, primile su odgovarajuću mješavinu DMSO-a i sterilne vode. Tretman je trajao ukupno 18 tjedana, a pumpice su mijenjane svakih 6 tjedana. Tijekom cijelog eksperimenta, stanje životinja kontinuirano je praćeno kako bi se osigurala njihova dobrobit.



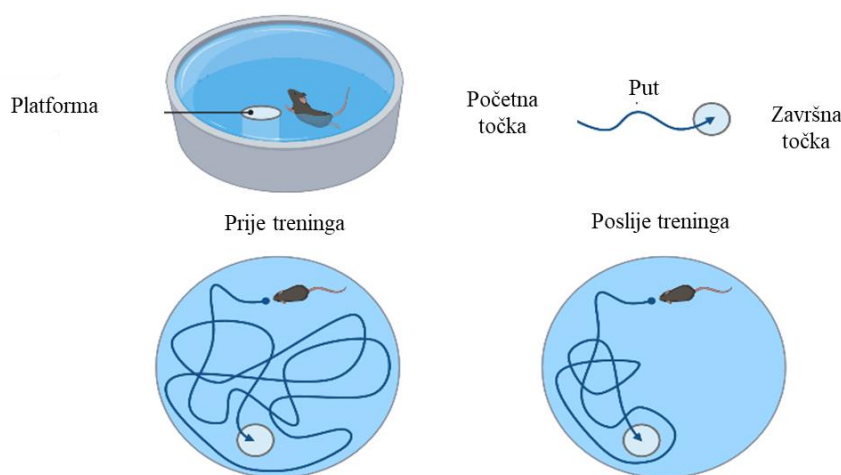
Slika 19. Princip rada mikro-osmotske pumpice. Preuzeto i prilagođeno prema <https://agnthos.se/alzet-osmotic-pumps/1483-alzet-pumps-overview.html>.

3.2.2. Testovi ponašanja

Kognitivne funkcije miševa ispitivane su pomoću Morrisovog vodenog labirinta (engl. *Morris water maze*, MWM), testa socijalne diskriminacije (engl. *Social discrimination test*, SDT) i testa Y-labirinta (engl. *Y-maze test*). Testiranja su provedena tijekom posljednjih deset dana tretmana DHEAS-om, a ponašanje životinja analizirano je pomoću softvera Noldus EthoVision XT (Noldus, Nizozemska).

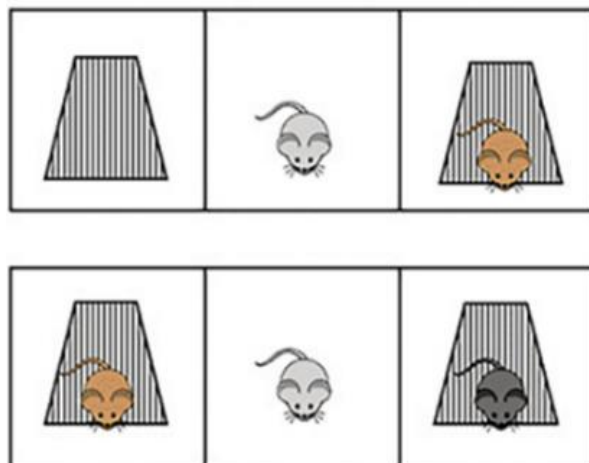
Test MWM (Slika 20.) koristi se za testiranje prostornog učenja i pamćenja. Pokus je proveden u okruglom bazenu promjera 110 cm i 60 cm visine, ispunjenim vodom temperature 23-25°C. Bazen je bio podijeljen u četiri kvadranta, pri čemu je u jednom od njih bila postavljena platforma 1 cm ispod površine vode. Prije početka testiranja, miševi su imali period prilagodbe na uvjete plivanja u bazenu. Pokus je trajao šest dana i imao je za cilj procjenu sposobnosti pronalaska skrivene platforme. Kada bi životinja pronašla platformu, ostavljane je na njoj 10 s, a zatim vraćena u kavez. Ako životinja nije pronašla platformu unutar 1 min tijekom prvog dana testa, bila je postavljena na platformu i zadržana na njoj 10 s. Svaka životinja testirana je četiri puta dnevno, s pauzama od 30 min predviđenima za odmor životinja. Redoslijed životinja koje su išle u testiranje bio je nasumičan. Zadnji dan pokusa, platforma je uklonjena, a mjerilo se vrijeme koje je životinja provela tražeći platformu u kvadrantu gdje se prethodnih dana ista nalazila, a mjerio se i broj ulazaka u odjeljke bez platforme, odnosno broj pogrešaka. Miševi s očuvanim prostornim pamćenjem pronalazili su platformu brže i uz manji broj pogrešaka,

dok su miševi s oštećenim kognitivnim funkcijama pokazivali dulje vrijeme traženja i više pogrešaka. Nakon svakog testiranja, životinje su osušene i stavljene pod infracrvenu lampu kako bi se ugrijale.



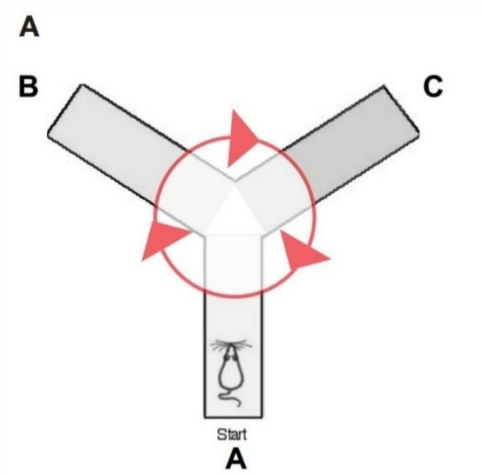
Slika 20. Morrisov vodeni labirint. Preuzeto i prilagođeno prema (299).

SDT (Slika 21.) se koristi za procjenu sposobnosti prepoznavanja i pamćenja drugih jedinki, temeljem prirodne sklonosti miševa socijalnoj interakciji. Životinje s očuvanim socijalnim pamćenjem provode više vremena istražujući nepoznatu životinju u odnosu na već poznatu životinju. Pokus je proveden u kutiji dimenzija 34 cm x 29 cm x 40 cm, koja je prije svakog testiranja očišćena 70%-tnim etanolom radi uklanjanja mirisa prethodne životinje. Redoslijed testiranja bio je nasumično određen. Tijekom prvih 10 min, testna je životinja stavljena u praznu kutiju kako bi se prilagodila i slobodno istražila prostor. Nakon toga, u suprotne kutove kutije postavljena su dva prazna kaveza, a testnoj životinji dano je 5 min za istraživanje. Zatim se u jedan od kavez uvodi nova životinja te se testnoj životinji omogućuje 5 min za uspostavljanje socijalne interakcije. Nakon toga, u drugi kavez se stavlja još jedna, do tada nepoznata životinja, a tijekom sljedećih 5 min mjeri se vrijeme koje životinja provodi u interakciji sa „starom“ (poznatom) i „novom“ (nepoznatom) životinjom. Što testna životinja više vremena provodi istražujući novu, to više ukazuje na očuvano socijalno pamćenje i sposobnost prepoznavanja.



Slika 21. Test socijalne diskriminacije. Preuzeto i prilagođeno prema (300).

Y-labirint (Slika 22.) je test koji se koristi za procjenu prostorne radne memorije i spontanog istraživačkog ponašanja. Test se temelji na prirodnoj sklonosti životinja da istražuju novo okruženje te se provodi u labirintu u obliku slova Y, koji se sastoji od tri kraka jednake duljine. Neposredno prije svakog testiranja, labirint je očišćen 70%-tnim etanolom, a oko njega su postavljeni bijeli zastori kako bi se spriječila orijentacija prema vanjskim vizualnim podražajima. Testna životinja postavljena je u središte labirinta čiji su krakovi dugi 40 cm, široki 9 cm te visoki 16 cm. Iznad labirinta bila je postavljena video kamera koja je snimala cijeli pokus. Krakovi su bili određeni oznakama "A", "B" i "C". Test je trajao 10 min, a ključni parametar koji se mjerio je postotak spontanijh izmjena između krakova, odnosno uzorak u kojem životinja ulazi u tri različita kraka, neovisno o redoslijedu. Visoki postotak takvih spontanijh izmjena upućuje na dobro funkcioniranje radne memorije, jer životinje pamte koje su krakove već posjetile i imaju tendenciju istraživati one koje još nisu. Smanjen postotak spontanijh izmjena ukazuje na poremećaj u funkciji radne memorije.



Slika 22. Y labirint test. Preuzeto i prilagođeno prema (301).

3.2.3. Izolacija plazme iz krvi miševa

Nakon provedenih testova ponašanja, životinje su anestetizirane intraperitonealnom primjenom 80 mg/kg ketamina i 8 mg/kg ksilazina, te su potom žrtvovane dekapitacijom. Krv miševa sakupljena je iskrvarenjem u plastične epruvete koje su sadržavale antikoagulans heparin. Neposredno nakon sakupljanja, uzorci krvi pohranjeni su na +4°C. Nakon toga uzorci su obrađeni na isti način kao i uzorci ispitanika, što je opisano u poglavlju 3.1.1. Nakon izdvajanja, dobivene plazme pohranjene su na -80°C do daljnje analize.

3.2.4. Izolacija prefrontalnog korteksa i hipokampusa iz mozga miševa

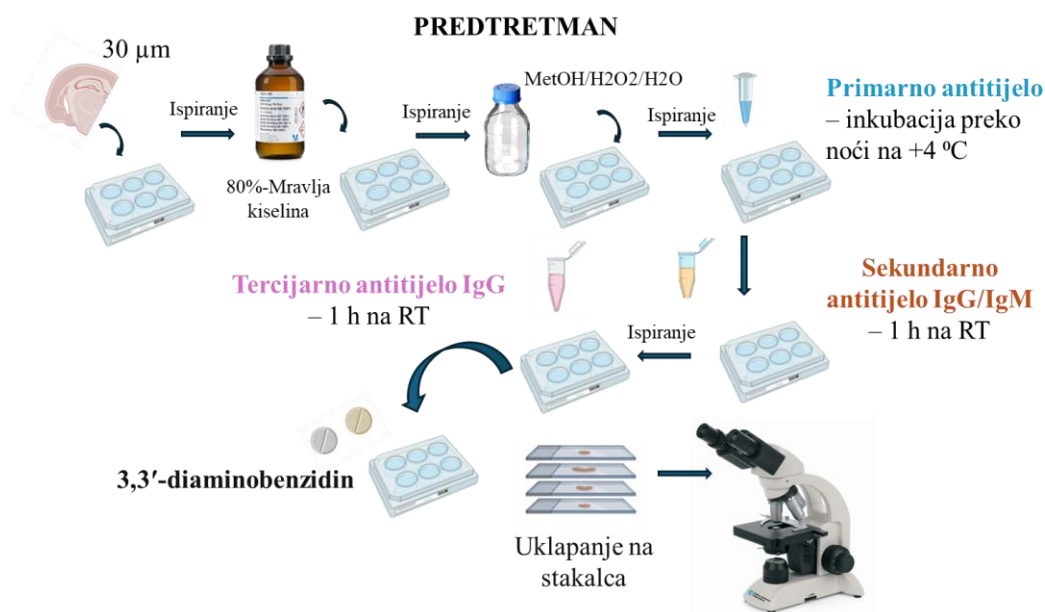
Nakon dekapitacije, mozak je brzo i pažljivo izoliran iz lubanje kako bi se očuvala morfologija i integritet tkiva. Cijeli postupak izdvajanja proveden je na ledu. Neposredno nakon ekstrakcije, mozak je sagitalno podijeljen na dvije polovice. Iz jedne polovice mozga izdvojen je prefrontalni korteks, koji je stavljen u sterilne plastične epruvete, kratko uronjen u tekući dušik te potom pohranjen na -80°C do daljnje obrade u svrhe metabolomske analize. Uzorci tkiva, još uvijek smrznuti, prebačeni su u nove prethodno označene i ohlađene plastične epruvete te su izvagani. Na tkivo je dodana hladna mješavina MetOH i H₂O u omjeru 1:1, pri čemu je na 1 mg tkiva dodano 10 µl otapala. Tkivo je zatim homogenizirano plastičnim tučkom, a homogenat je dodatno resuspendiran pomoću pipete kako bi se postigla potpuna razgradnja tkiva. U zadnjem koraku uzorci tkiva su ultrasonificirani tijekom 2 min. Dobiveni uzorci tkiva su pospremljeni

na -80°C do sljedeće upotrebe. Druga polovica mozga je fiksirana u 4% paraformaldehidu (PFA) u 0,1 M PBS-u (pH 7,4) tijekom 24 h na +4°C. Sljedeći dan mozgovi su prebačeni u 30%-tnu otopinu saharoze u PBS-u, također na +4°C, preko noći. Nakon dehidracije, polovice su serijski rezane pomoću mikrotoma Leica SM2010 R (Leica Biosystems, Njemačka), na debljinu od 30 µm. Dobiveni rezovi pohranjeni su u krioprotektivnu tekućinu (30% etilen-glikol, 30% glicerol u 0,1 M PBS-u) i čuvani na -80°C do daljnje imunohistokemijske obrade.

3.2.5. Imunohistokemija

U svrhu potvrđivanja *in vivo* modela AB-a, na rezovima hipokampusa provedeno je imunohistokemijsko bojenje kako bi se utvrdila prisutnost amiloidnih plakova, temeljem specifičnog vezanja antigena Aβ-42 i odgovarajućeg antitijela. Cijeli protokol proveden je u pločicama s 24 jažice. Rezovi hipokampusa su izvađeni iz zamrzivača i ostavljeni na sobnu temperaturu kako bi se otopili, nakon čega su prebačeni u jažice ispunjene PBS-om (1X, pH 7,4) radi ispiranja. Za postizanje visoke imunoreaktivnosti, provedena je metoda otkrivanja antigena tako da su rezovi inkubirani 5 min u 80%-tnoj mravljoj kiselini. Mravlja kiselina denaturira proteine i time izlaže epitopske regije antigena koje mogu biti zamaskirane tijekom fiksacije PFA-om, čime se omogućuje bolja dostupnost antitijelu. Nakon tretmana, rezovi su triput isprani u dH₂O po 5 min. Kako bi se spriječilo nespecifično pozadinsko obojenje tijekom bojanja diaminobenzidinom (DAB, 3,3'-diaminobenzidin, Sigma Aldrich), provedeno je blokiranje endogene peroksidazne aktivnosti. Otopina za predtretman priprema se neposredno prije uporabe dodavanjem 300 ml metanola u 100 ml dH₂O, a zatim i 400 µl H₂O₂. Rezovi su inkubirani u toj otopini 30 min na sobnoj temperaturi, potom tri puta isprani u PBS-u (1X, pH 7,4) po 10 min. Za smanjenje nespecifičnog vezanja antitijela provedeno je blokiranje epitopa koristeći 5% BSA (*bovine serum albumin*) pomiješanog s 0,5% Triton X-100 u 1x PBS-u. Rezovi su inkubirani u 500 µl blokirajuće otopine 1 h na sobnoj temperaturi, a zatim triput isprani u PBS-u (1X, pH 7,4) po 10 min. Nakon toga uslijedila je inkubacija u primarnom antitijelu anti-Aβ-42 (Invitrogen, SAD) razrijeđenom u omjeru 1:300 u blokirajućoj otopini. Na svaki rez dodano je 500 µl primarnog antitijela, a pločica je prekrivena parafilmom kako bi se spriječilo isparavanje. Inkubacija je trajala preko noći na +4°C. Sljedeći dan uzorci su triput isprani u PBS-u (1X, pH 7,4) po 10 min, nakon čega je dodano sekundarno antitijelo iz kompleta ABC Vectastain (Vector Laboratories, SAD), pripremljeno u razrjeđenju 1:200 u 50%-tnoj razrijeđenoj blokirajućoj otopini. Rezovi su inkubirani na 1 h na sobnoj temperaturi, a potom isprani u PBS-u (1X, pH 7,4). Zatim je pripremljeno tercijarno antitijelo IgG iz komercijalnog kompleta ABC Vectastain na način da se 5 µl avidina i 5 µl

biotina dodalo u razrijeđenu blokirajuću otopinu. Avidin ima visok afinitet za biotin, a kompleks ABC pojačava signal jer nosi više molekula enzima peroksidaze na jedno vezano antitijelo. Inkubacija u kompleksu ABC trajala je 1 h na sobnoj temperaturi. Za završnu detekciju korištena je otopina DAB-a koja u prisutnosti peroksidaze stvara smeđu obojenost na mjestu vezanja antitijela za antigen. Otopina DAB-a je pripremljena otapanjem jedne zlatne (urea vodikov peroksid) i srebrne (DAB/kobalt) tablete u 5 ml dH₂O, uz snažno miješanje. Na svaki rez dodano je oko 100 µl otopine DAB-a, koja je aktivna samo 20 min od pripreme. Nakon otprilike 5 min, rezovi su isprani triput u PBS-u (1X, pH 7,4) po 10 min. Rezovi su zatim prebačeni na prethodno označena stakalca, osušeni na zraku i prekriveni pokrovnim stakalcem pomoću sredstva za uklapanje (*Fluoromount Aqueous Mounting Medium*, Sigma Aldrich). Nakon sušenja, uzorci su pregledani pod svjetlosnim mikroskopom Olympus BX51 (Olympus, Japan) (Slika 23.).



Slika 23. Prikaz postupka imunohistokemijskog bojanja za detekciju amiloidnih plakova na uzorcima hipokampusa miševa.

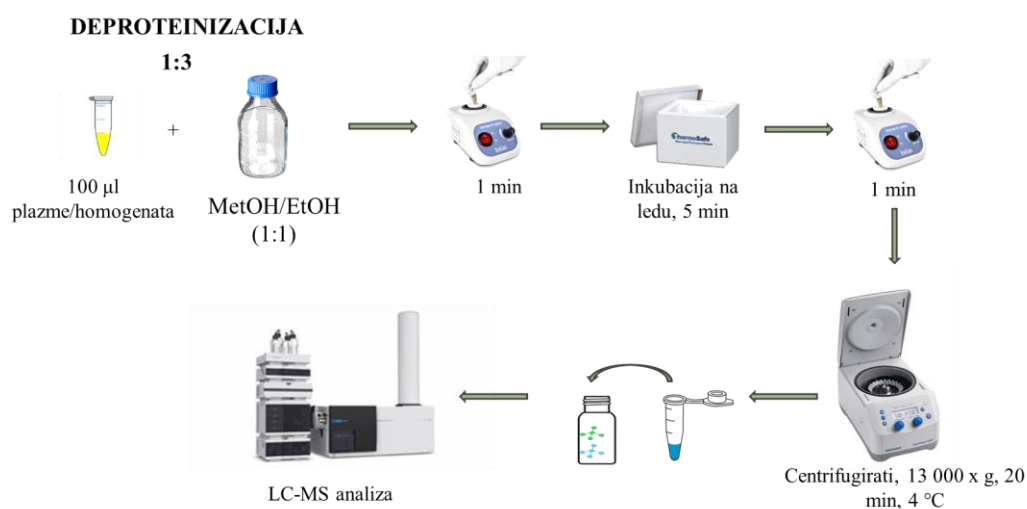
3.3. Metabolomske analize

3.3.1. Priprema uzoraka za analizu metodom LC-MS

Na dan analize, uzorci plazme i homogenata prefrontalnog korteksa izvađeni su iz zamrzivača i stavljeni na led 30 min kako bi se odmrznuli. Nakon otapanja, uzorci su

snažno promiješani na vorteks mješalici tijekom 2 min. Za potrebe analize metodom LC-MS, izdvojeno je 100 μ l homogenata tkiva na koje je dodano 320 μ l metanola, radi precipitacije proteina i ekstrakcija metabolita (Slika 24.). Uzorci su zatim snažno miješani na vorteks mješalici tijekom 20 min, nakon čega je na svaki uzorak dodano 80 μ l MTBE-a (metil tert-butil eter) u svrhu dodatne ekstrakcije lipofilnih spojeva. Uzorci su ponovno miješani na vorteks mješalici 1 h, a potom je uslijedilo centrifugiranje u trajanju od 20 min, pri 4000 x g i 20°C. Dobiveni supernatant pažljivo je izdvojen, a 100 μ l preneseno je u staklene vijale s insertom za analizu metodom LC-MS. Tako pripremljeni uzorci bili su spremni za postavljanje u uređaj i za analizu.

U slučaju uzoraka plazme, 100 μ l plazme pomiješano je s 300 μ l hladne mješavine metanola i etanola u omjeru 1:1. Uzorci su snažno promiješani na vorteks mješalici 1 min, zatim inkubirani 5 min na ledu i ponovno kratko promiješani. Nakon toga su centrifugirani 20 min pri 2500 rpm i 4°C. Oko 200 μ l dobivenog supernatanta preneseno je u staklene vijale s insertom. Pripremljeni uzorci bili su spremni za analizu metodom LC-MS.



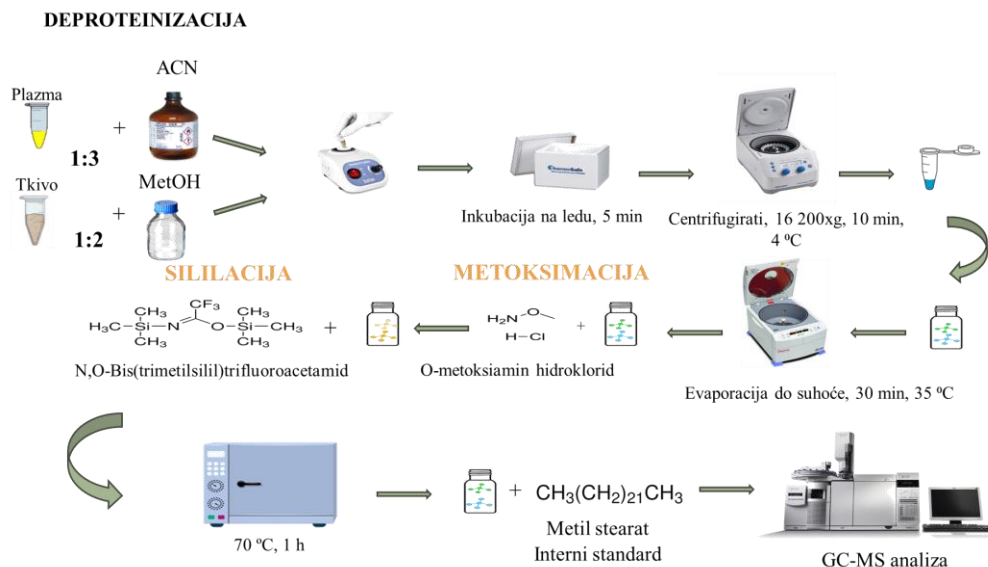
Slika 24. Prikaz postupka pripreme uzoraka homogenata tkiva i plazme za analizu metodom LC-MS.

3.3.2. Priprema uzoraka za analizu metodom GC-MS

Za analizu metodom GC-MS (Slika 24.), iz homogenata je izdvojeno 150 μ l uzorka, koji je prebačen u nove plastične epruvete, nakon čega je na uzorak dodano 300 μ l metanola. Uzorci su snažno miješani na vorteks mješalici tijekom 20 min, a zatim centrifugirani 20

min pri 4000 rpm i 4°C. Dobiveni supernatant pažljivo je izdvojen, a 300 µl preneseno je u staklene vijale s insertom koje su pogodne za analizu metodom GC-MS. Uzorci su zatim isparavani na centrifugalnom vakuumskom koncentratoru (Eppendorf Concentrator plus, Njemačka) pri 30°C. Nakon potpunog isušivanja, koje je otprilike trajalo 2 h, uslijedila je derivatizacija kako bi se uzorci učinili pogodnima za analizu metodom GC-MS. Prvi korak je bila metoksimacija. Na svaki uzorak dodano je 20 µl O-metoksiamin hidroklorida (15 mg/ml u piridinu) te su uzorci snažno promiješani na vorteks mješalici tijekom 5 min. Zatim su provedena tri ciklusa ultrasonificiranja uzoraka po 20 s i snažnog miješanja na vorteks mješalici u trajanju od 2 min po ciklusu. Uzorci su zatim prekriveni aluminijskom folijom i pohranjeni u mraku na sobnoj temperaturi tijekom 16 h. Slijedeći dan proveden je korak sililacije. Na svaki uzorak dodano je 20 µl BSTFA s 1% TMCS, uzorci su snažno promiješani 5 min i stavljeni u pećnicu 1 h na 70°C. Nakon inkubacije, uzorci su ohlađeni na sobnu temperaturu (za navedeno je potrebno oko 30 min). Potom je u svaki uzorak dodan interni standard, odnosno C18:0 metil ester (20 ppm) u heptanu. Uzorci su ponovno promiješani na vorteks mješalici i centrifugirani 15 min pri 2500 rpm i 20°C. Cijeli postupak metoksimacije i sililacije provodio se pod zaštitnom maskom i u digestoru zbog prisutnosti hlapljivih i toksičnih spojeva.

Uzorci plazme pomiješani su s hladnim acetonitrilom u omjeru 1:3 te promiješani na vorteks mješalici tijekom 2 min. Nakon inkubacije 5 min na ledu, uzorci su centrifugirani 10 min pri 15 400 x g i 4°C. Zatim je 100 µl supernatanta preneseno je u staklene vijale s insertom i isušeno u centrifugalnom vakuumskom koncentratoru (Eppendorf Concentrator plus, Njemačka) na 30°C. Slijedeći koraci metoksimacije i sililacije provedeni su na isti način kao i u slučaju pripreme uzoraka homogenata tkiva za analizu metodom GC-MS.



Slika 25. Prikaz postupka pripreme uzoraka homogenata tkiva i plazme za analizu metodom GC-MS.

3.3.3. Priprema negativnih kontrola (slijepih proba) i uzoraka kontrole kvalitete

Od svakog uzorka plazme i homogenata tkiva izdvojeno je 15 µl kako bi se pripremila mješavina svih uzoraka koji ulaze u analizu, odnosno uzorak kontrole kvalitete (engl. *quality control*, QC). QC uzorci prolaze isti protokol pripreme kao i svi ostali uzorci te služe za stabilizaciju kromatografskog sustava i otkrivanje moguće instrumentalne ili analitičke varijabilnosti. Analiziraju se na početku analize te nakon otprilike svakih 10 uzoraka. Uz uzorke QC, u metabolomskim analizama važnu ulogu imaju i uzorci negativne kontrole, odnosno slijepe probe (engl. *blank*). Oni se pripremaju dodavanjem vode (umjesto uzorka) u otapalo koje se koristi u analizi, a zatim se tretiraju na isti način kao i svi ostali uzorci. Negativne kontrole pokazatelj su prisutnosti mogućih kontaminacija, koje mogu nastati tijekom pripreme ili injektiranja uzoraka. Također, služe i da se pri kasnijoj obradi podataka mogu izdvojiti oni metaboliti koji potječu isključivo od otapala i kemikalija koje se koriste za pripremu uzoraka. Negativne kontrole se injektiraju na početku i na kraju analize.

3.3.4. Postavke analitičkih metoda

3.3.4.1. Tekućinska kromatografija spregnuta sa spektrometrijom masa (LC-MS)

Za metabolomsku analizu uzoraka plazme i homogenata tkiva korišten je sustav tekućinske kromatografije Agilent 1290 infinity II LC (Agilent Technologies, SAD) spojen

na detektor Agilent 6550 iFunnel Q-TOF (Agilent Technologies, SAD). Za razdvajanje metabolita korištena je RPLC Discovery® HS C18 HPLC kolona (150 × 2,1 mm, 3 µm; Supelco, SAD). Svaki uzorak ubrizgan je u volumenu od 10 µl u kolonu, koja je tijekom analize održavana na 40°C. Brzina protoka postavljena je na 0,6 ml/min, uz gradijent mobilnih faza. Mobilna faza A sadržavala je vodu s 0,1% mravlje kiseline, a mobilna faza B acetonitril s 0,1% mravlje kiseline. Analiza je započela s 25% mobilne faze B, koja se postupno povećavala do 95% u trajanju od 35 min (0-35 min). Nakon toga, gradijent je vraćen na početne uvjete (25% mobilne faze B) u roku od 1 min (35-36 min) te su ti uvjeti održavani do kraja analize (36-45 min). Korišten je ESI način ionizacije, a kako bi se obuhvatio širi spektar metabolita, analiza je provedena u pozitivnom i negativnom načinu ionizacije. Za svaki način ionizacije korištene su dvije referentne mase kako bi se osigurala točnost izmjerenih masa. Za pozitivni način ionizacije korištene su referentne mase 121.0509 (purin, detektiran kao m/z $[C_5H_4N_4 + H]^+$) i 922.0098 (HP-0921, detektiran kao m/z $[C_{18}H_{18}O_6N_3P_3F_{24} + H]^+$). Za negativni način ionizacije korištene su referentne mase 112.9855 (TFA(NH₄), detektiran kao m/z $[C_2O_2F_3(NH_4) - H]^-$) i 966.0007 (HP-0921 + FA, detektiran kao m/z $[C_{18}H_{18}O_6N_3P_3F_{24} + FA - H]^-$). Analiza je provedena u skenirajućem načinu rada u rasponu od 50 do 1000 m/z , s brzinom od 1,20 skena/s. Ukupno trajanje analize po jednom uzorku iznosilo je 45 min. Za identifikaciju značajnih metabolita u uzorcima ljudske plazme i mišjeg tkiva provedena je MS/MS analiza primjenom iste LC-MS platforme i kromatografskih uvjeta kao i u slučaju inicijalne analize LC-MS. Fragmentacija je postignuta metodom kolizijski inducirane disocijacije CID, pri čemu su ciljani ioni prethodno odabrani na temelju točne mase i vremena zadržavanja. U analizi su korištene tri razine energije sudara: 10 eV, 20 eV i 40 eV. U uzorcima mišje plazme provedena je samo tentativna identifikacija, bez mogućnosti potpune potvrde identifikacije metabolita analizom MS/MS spektra.

3.3.4.2. Plinska kromatografija spregnuta sa spektrometrijom masa (GC-MS)

Za metabolomsko profiliranje uzoraka plazme i homogenata tkiva korišten je plinski kromatograf Agilent 7890A s automatskim injektorom Agilent 7693 (Agilent Technologies, SAD), spregnut sa spektrometrom masa Agilent 5975 (Agilent Technologies, SAD) s jednostrukim kvadrupolom. Derivatizirani uzorci injektirani su nasumičnim redoslijedom, pri čemu je volumen injektiranja iznosio 2 µl uz omjer razdvajanja 1:10. Za razdvajanje spojeva korištena je GC kolona DB-5MS (duljina 30 m, unutarnji promjer 0,25 mm, debljina filma 0,25 µm sa stacionarnom fazom 95% dimetilpolisiloksan/5% difenilpolisiloksan) s integriranom predkolonom (10 m J&W, integrirana s Agilent 122-5532G). Analiza jednog uzorka trajala je oko 37,5 minuta. Spojevi su kroz kolonu nošeni helijem kao prijenosnim plinom, pri konstantnom protoku

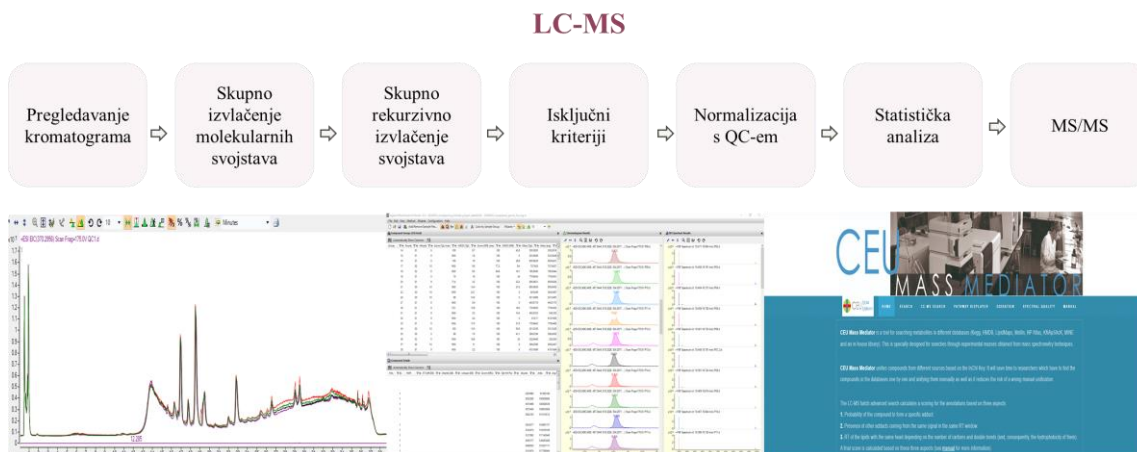
od 1 ml/min. Sustav je radio u skenirajućem načinu rada, s rasponom skeniranja masa od 50 do 600 m/z i brzinom od 2 spektra/s, koristeći ionizaciju EI pri energiji od 70 eV. Temperatura injektora održavana je konstantno na 250°C. Temperatura peći bila je programirana na 60°C tijekom prve minute, nakon čega je brzinom od 10°C/min došla do konačne temperature od 325°C. Ova temperatura zadržana je do 10 min prije početka hlađenja sustava i injektiranja sljedećeg uzorka. Temperatura prijenosne linije detektora postavljena je na 290°C, dok su temperature ionskog izvora i kvadrupola iznosile 230°C, odnosno 150°C.

3.3.5. Obrada podataka

3.3.5.1. Obrada podataka nakon analize metodom LC-MS

Obrada podataka dobivenih analizom LC-MS (Slika 26.) započela je pregledom kromatograma, referentnih masa te krivulje tlaka binarne pumpe, kako bi se provjerila reproducibilnost i moguća analitička varijabilnost. Za navedeno je korišten program MassHunter Qualitative Analysis (verzija 10.00, Agilent Technologies, SAD). Nakon toga, neobrađeni podaci su uvezeni u program MassHunter Profinder (verzija 10.00, Agilent Technologies, SAD) radi dekonvolucije signala. U prvom koraku dekonvolucije korišten je algoritam skupnog izvlačenja molekularnih svojstava (engl. *molecular feature extraction*, MFE), koji stvara listu mogućih molekularnih obilježja temeljenih na Gaussovoj raspodjeli koeluirajućih iona, povezanih prema naboju, izotopskoj distribuciji te prisutnosti različitih adukata i dimera. Zatim je proveden drugi korak dekonvolucije pomoću algoritma skupnog rekurzivnog izvlačenja svojstava (engl. *recursive feature extraction*, RFE), koji koristi rezultate dobivene algoritmom MFE i dodatno poboljšava kvalitetu konačne liste obilježja. Konačno dobivena lista sadržavala je potencijalne metabolite prikazane kao m/z vrijednosti, intenzitete signala, vremena zadržavanja u koloni (retencijsko vrijeme) i pripadajuće spektre masa za usporedbu između uzoraka. Za dobivanje preliminarnog popisa statistički značajnih masa korišten je online alat CEU Mass Mediator (<https://ceumass.eps.uspceu.es/>), uz maksimalnu dopuštenu pogrešku mase ± 20 ppm. Kao parametri za ekstrakciju odabrani su ioni H^+ , Na^+ i K^+ za pozitivni način ionizacije, te $HCOO^-$ za negativni način ionizacije. Neutralni gubitak vode bio je uključen za obje ionizacijske metode (302). Spojevi su identificirani na temelju točne mase i usporedbe obrasca izotopa, a njihova biološka uloga provjerena je kako bi se isključile nerelevantne identifikacije. Na taj način dobiven je privremeni popis značajno promijenjenih metabolita. Konačna identifikacija provedena je analizom i usporedbom MS/MS spektara u pozitivnom i negativnom načinu ionizacije za uzorke ljudske plazme i mišjeg tkiva, koja je izvedena isključivo za statistički značajne i prethodno anotirane spojeve. Identifikacija

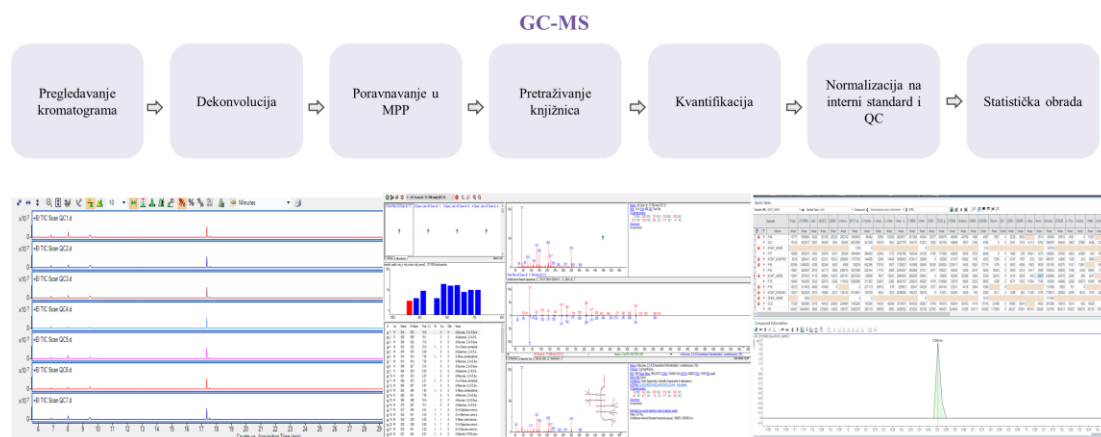
koristeći MS/MS spektre je temeljena na usporedbi fragmentacijskih spektara s referentnim spektrom u bazama podataka kao što su HMDB, METLIN, KEGG i LipidMaps.



Slika 26. Prikaz postupka obrade podataka dobivenih LC-MS analizom.

3.3.5.2. Obrada podataka nakon analize metodom GC-MS

Ukupni ionski kromatogrami dobiveni nakon analize metodom GC-MS (Slika 27.) vizualno su pregledani pomoću programa MassHunter Qualitative Analysis (Agilent Technologies, SAD) radi procjene kvalitete analize i reproducibilnosti. Nakon pregleda kromatograma, napravljena je dekonvolucija signala pomoću programa MassHunter Unknowns Analysis (Agilent Technologies, SAD), čime su iz kompleksnih kromatograma izdvojeni pojedinačni spektri spojeva. Program Mass Profiler Professional (Agilent Technologies, SAD) korišten je za poravnavanje signala, s ciljem usklađivanja vremena zadržavanja i m/z vrijednosti spojeva između uzoraka (302). Kvantifikacija spojeva provedena je određivanjem površine ispod vrška (pika) kromatograma koristeći programski alat MassHunter Quantitative Analysis (Agilent Technologies, SAD). Kvaliteta analize dodatno je potvrđena provjerom ponovljivosti signala unutarnjeg standarda, metil stearata, te su svi uzorci prihvaćeni za daljnju analizu. Nakon dobivanja liste spojeva, za identifikaciju metabolita korištene su baze podataka NIST (*National Institute of Standards and Technology Mass Spectral Library*) i knjižnica Fiehn RTL (303), usporedbom spektara uzoraka prema obrascima fragmentacije i vremena zadržavanja. Knjižnica Fiehn RTL prvenstveno za identifikaciju koristi vrijeme zadržavanja pojedinih spojeva/metabolita, dok baza podataka NIST radi identifikaciju na temelju obrazaca fragmentacije pojedinih spojeva/metabolita. Koristeći obje baze, odnosno knjižnice, dobiva se pouzdanija identifikacija metabolita u analiziranim uzorcima.



Slika 27. Prikaz obrade podataka dobivenih GC-MS analizom.

3.3.5.3. Statistička obrada podataka

Demografske i kliničke karakteristike ispitanika analizirane su provjerom normalnosti raspodjele koristeći Kolmogorov-Smirnov test. Budući da testirane varijable nisu pokazivale normalnu distribuciju, za usporedbu između skupina korišten je neparametrijski Kruskal-Wallis ANOVA test rangova, uz Dunnov post-hoc test za višestruke usporedbe. Prije statističke analize, podaci dobiveni analizama GC-MS i LC-MS i filtrirani su prema kriterijima koje su postavili Godzien i sur. (304) kako bi se osigurala kvaliteta dobivenih podataka. Spoj je zadržan ako je bio prisutan u $\geq 80\%$ QC uzoraka s relativnom standardnom devijacijom (RSD) $< 30\%$ ili ako je bio prisutan u $< 20\%$ QC uzoraka, ali se pojavljivao u $\geq 50\%$ uzoraka unutar određene skupine. Za korekciju mogućih unutar-grupnih varijacija korišten je algoritam *QC-Robust Spline Correction* (QC-RSC), temeljen na metodi regresije potpornih vektora (*support vector regression*) (305). Analiza je provedena pomoću programa MATLAB i knjižnice LIBSVM (306). Nakon unutar-grupne korekcije, podaci su dodatno normalizirani kako bi se smanjile neželjene varijacije uzrokovane tehničkim pogreškama tijekom pripreme uzoraka. Normalnost raspodjele podataka dobivenih metabolomskom analizom testirana je Shapiro-Wilk testom. Za kromatografske pikove koji su imali normalnu raspodjelu, proveden je dodatno Leveneov test radi provjere jednakosti varijanci (vrijednost $\leq 0,05$ označava nejednake varijance, dok vrijednost $> 0,05$ označava jednake varijance), kako bi se odabrao odgovarajući t-test (Microsoft® Office Excel). Kako bi se smanjila vjerojatnost pogrešaka zbog višestrukog testiranja, primijenjena je Benjamini-Hochberg metoda za kontrolu stope lažno pozitivnih rezultata (engl. *False Discovery Rate*, FDR). Dodatno, kako bi se procijenile razlike između više skupina, provedena je ANOVA, za podatke s normalnom distribucijom, odnosno Kruskal-Wallis test, za neparametrijske podatke (IBM SPSS

Statistics 21). Za metabolite koji su pokazali statističku značajnost provedena je post-hoc analiza kako bi se identificirale specifične razlike između pojedinih uspoređivanih grupa. Za multivarijatne analize podataka koji su dobiveni na ljudskim ispitanicima, korišten je softver SIMCA-P+ (SIMCA® 15 User Guide, Umetrics), koji je uključivao izradu modela analize glavnih komponenti (*Principal Component Analysis*, PCA), diskriminacijske analize parcijalnih najmanjih kvadrata (*Partial Least Square-Discriminant analysis*, PLS-DA) i ortogonalne metode PLS-DA (*Orthogonal Partial Least Square-Discriminant analysis*, OPLS-DA). Multivarijatna analiza podataka dobivenih na mišjim uzorcima napravljena je u online programu Metaboanalyst (verzija 6.0). Na temelju rezultata metode OPLS-DA izrađeni su vulkanski dijagrami, u kojima su varijable prikazane prema važnosti svog doprinosa u projekciji (VIP vrijednosti). Promjene u razinama metabolita smatrane su značajnima ukoliko su ispunjavale sljedeće kriterije: $p \leq 0,05$ (prije, a posebice nakon Benjamini-Hochberg korekcije), $VIP > 1$. Postotak promjene (% Δ) izračunat je prema formuli: $[(\text{prosječna vrijednost u ispitivanoj skupini} - \text{prosječna vrijednost u kontrolnoj skupini}) / (\text{prosječna vrijednost u kontrolnoj skupini})] \times 100$. Pozitivne vrijednosti postotka promjene ukazuju na porast, dok negativne vrijednosti označavaju pad razina specifičnog metabolita u ispitivanoj skupini u odnosu na kontrolnu skupinu.

4. REZULTATI

3.4. Ljudski ispitanici

3.4.1. Demografski podaci

Osobe s dijagnozom AB-a, ispitanici s dijagnozom MCI-a i zdravi kontrolni ispitanici bili su dobnno usklađeni muškarci bijele rase te hrvatskog porijekla. U istraživanje je uključeno 40 ispitanika oboljelih od AB-a (prosječna dob: $67,0 \pm 89,0$), 40 osoba s MCI-jem (prosječna dob: $74,0 \pm 87,0$) i 40 zdravih kontrolnih ispitanika (prosječna dob: $65,9 \pm 77,09$). U uzorcima krvi svih ispitanika određene su razine glukoze, ukupnog kolesterola, LDL-kolesterola, HDL-kolesterola i triglicerida kako bi se isključio utjecaj određenih somatskih bolesti na metabolički profil. Potrebna veličina uzorka (broj ispitanika) određena je na temelju procedure opisane u radu kojeg su objavili Billoir i sur. (307).

Demografski podaci i usporedba istih između grupa ispitanika uključenih u istraživanje prikazani su u Tablici 2. Normalna distribucija svih demografskih varijabli testirana je Kolmogorov-Smirnovim testom. S obzirom na odstupanja od normalne distribucije, za usporedbu demografskih varijabli između skupina ispitanika korišten je neparametrijski Kruskal-Wallisov test s Dunnovim post-hoc testom. Ispitanici su se značajno razlikovali prema dobi ($p < 0,001$), indeksu tjelesne mase ($p < 0,001$), razini glukoze u krvi ($p = 0,008$) te kognitivnim sposobnostima procijenjenim pomoću testa MMSE ($p < 0,001$). Naime, ispitanici oboljeli od AB-a bili su značajno stariji od ispitanika s MCI-jem ($p = 0,003$; Dunnov post-hoc test) i zdravih ispitanika ($p < 0,001$; Dunnov post-hoc test). Razlika u indeksu tjelesne mase rezultat je značajno nižeg indeksa u bolesnika s AB-om ($p < 0,001$; Dunnov post-hoc test) i MCI-jem ($p < 0,001$; Dunnov post-hoc test) u usporedbi sa zdravim kontrolnim ispitanicima. Razina glukoze u krvi bila je slična u skupini ispitanika s MCI-jem i zdravoj kontrolnoj skupini, kao i između bolesnika s AB-om i ispitanika s MCI-jem. Međutim, skupina ispitanika s dijagnozom AB-a imala je značajno višu razinu glukoze u krvi u usporedbi s zdravim kontrolnim ispitanicima ($p = 0,006$; Dunnov post-hoc test). Očekivano, bolesnici s AB-om imali su značajno niži rezultat (manji broj bodova) na testu MMSE u usporedbi s ispitanicima s MCI-jem ($p < 0,001$; Dunnov post-hoc test) i zdravim kontrolnim ispitanicima ($p < 0,001$; Dunnov post-hoc test). Dodatno, osobe s MCI-jem imale su izraženije kognitivno oštećenje u odnosu na zdrave ispitanike ($p < 0,001$; Dunnov post-hoc test). Svi ispitanici koji su uključeni u istraživanje imali su slične razine ukupnog kolesterola ($p = 0,051$), HDL-kolesterola ($p = 0,090$), LDL-kolesterola ($p = 0,311$) i triglicerida ($p = 0,176$) (Tablica 2.).

Tablica 2. Demografski i klinički podaci zdravih kontrolnih ispitanika, ispitanika s MCI-jem i osoba oboljelih od AB-a.

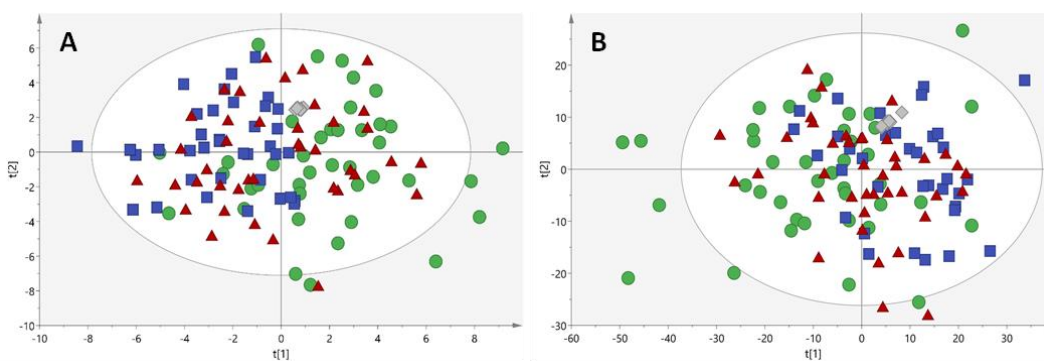
Parametri	Zdrave kontrole (N = 40)			MCI (N = 40)			AB (N = 40)			Kruskal-Wallis ANOVA df=2	
	medijan	min	max	medijan	min	max	medijan	min	max	p	H
Dob (godine)	69,0	65,0	77,0	74,0	67,0	87,0	78,0	67,0	89,0	<0.001	53,55
ITM (kg/m²)	30,5	23,0	37,0	22,0	18,0	29,0	23,4	19,0	32,0	<0.001	42,75
Ukupni kolesterol (mmol/l)	4,5	2,9	7,8	5,7	3,2	8,8	5,8	3,2	8,8	0,051	5,95
HDL-kolesterol (mmol/l)	1,2	0,5	2,0	1,4	0,7	3,0	1,3	0,7	3,0	0,090	4,81
LDL-kolesterol (mmol/l)	2,8	1,3	5,4	3,1	0,8	4,9	3,3	0,8	5,8	0,311	2,33
Trigliceridi	1,6	0,6	3,7	1,9	0,8	6,7	1,9	0,8	6,7	0,176	3,48
Glukoza u krvi (mmol/l)	5,0	3,4	10,2	5,5	4,5	11,8	5,7	4,7	11,8	0,008	9,58
MMSE bodovi	30,0	29,0	30,0	27,0	24,0	28,0	14,0	9,0	23,0	<0.001	107,37

AB - Alzheimerova bolest, HDL - lipoprotein visoke gustoće, ITM - indeks tjelesne mase, LDL - lipoprotein niske gustoće, MCI - blagi neurokognitivni poremećaj, MMSE - test procjene mentalnog stanja, N - broj ispitanika

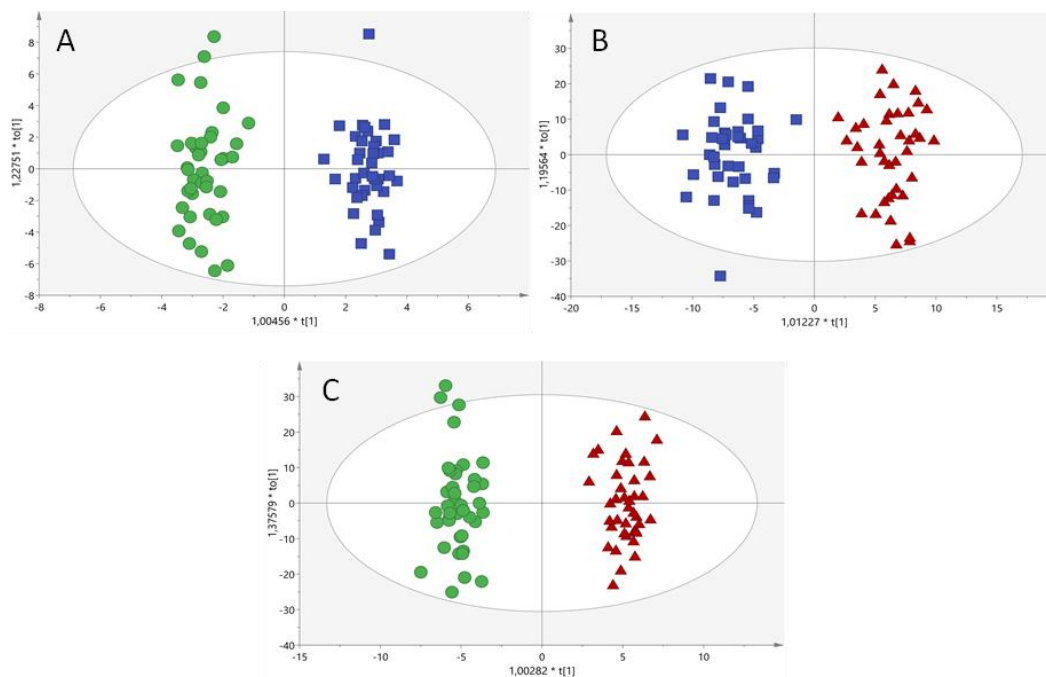
3.4.2. Metabolomsko profiliranje metodom LC-MS

Analiza ljudske plazme metodom LC-MS omogućila je detekciju velikog broja metabolita. Konačna lista različitih metabolita, odnosno detektiranih spojeva, dobivena nakon provedbe metode RFE uz pomoć programa Agilenta MassHunter Profinder, uključivala je 761 spoj u pozitivnom i 783 spoja u negativnom načinu ionizacije.

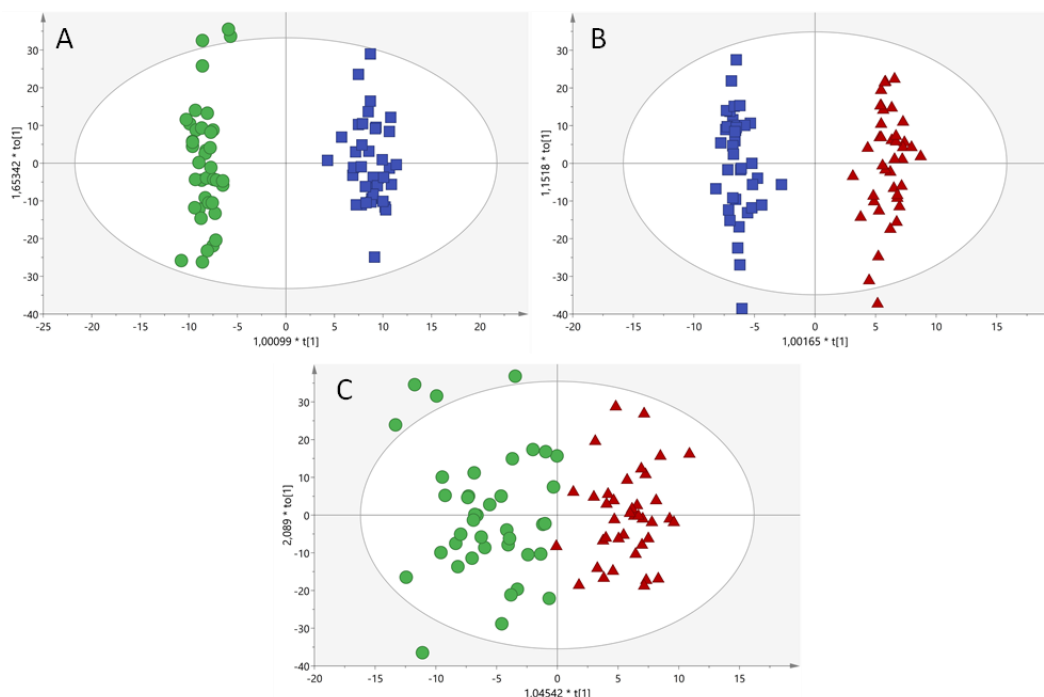
Graf dobiven metodom PCA za sve skupine pokazao je najveće razdvajanje podataka između zdravih kontrolnih ispitanika i bolesnika s AB-om, pri čemu su podaci koji odgovaraju ispitanicima s MCI-jem bili smještene između ovih dviju skupina (Slika 28.). Tijesno grupiranje uzoraka QC na PCA grafu potvrđuje analitičku pouzdanost metode i pokazuje da je normalizacija podataka ispravila sve potencijalne instrumentalne varijacije, čime se dodatno potvrđuju biološke razlike između ispitivanih skupina (Slika 28.). Nakon analize PCA, za oba načina ionizacije generiran je model OPLS-DA kako bi se odredila razina diskriminacije između dviju odvojenih skupina uzoraka: zdrave kontrole naspram ispitanika s AB-om, osobe s MCI-jem naspram zdravih kontrola te ispitanici s dijagnozom MCI-ja naspram bolesnika s AB-om (Slika 29. i 30.). Vrijednosti VIP, koje su generirane iz modela OPLS-DA, korištene su za identifikaciju metabolita koji su najviše doprinosili uočenim razlikama između skupina. Nakon kombinirane multivarijatne i univarijatne statističke analize, metodom LC-MS/MS identificirana su 23 značajno promijenjena metabolita (Tablica 3.).



Slika 28. Grafički prikaz rezultata analize PCA na podacima dobivenima metabolomskim profiliranjem uzoraka ljudske plazme metodom LC-MS. Metodom LC-MS analizirani su uzorci plazmi zdravih kontrolnih ispitanika, ispitanika s MCI-jem te bolesnika oboljelih od AB-a. **A)** Neciljano metabolomsko profiliranje metodom LC-MS u pozitivnom načinu ionizacije ($R^2X(\text{cum}) = 0,751$); **B)** Neciljano metabolomsko profiliranje metodom LC-MS u negativnom načinu ionizacije ($R^2X(\text{cum}) = 0,368$). Zdrave kontrole su označene plavom bojom, ispitanici s MCI-jem crvenom, bolesnici s AB-om zelenom, a uzorci QC sivom bojom.



Slika 29. Grafički prikaz rezultata analize OPLS-DA na podacima dobivenima metabolomskim profiliranjem uzoraka ljudske plazme metodom LC-MS u pozitivnom načinu ionizacije. **A)** Analiza OPLS-DA na podacima dobivenima metabolomskim profiliranjem uzoraka plazme bolesnika s AB-om i zdravih kontrolnih ispitanika ($R^2 = 0,963$; $Q^2 = 0,927$) **B)** Analiza OPLS-DA na podacima dobivenima metabolomskim profiliranjem uzoraka plazme ispitanika s MCI-jem i zdravih kontrolnih ispitanika ($R^2 = 0,924$; $Q^2 = 0,792$) **C)** Analiza OPLS-DA na podacima dobivenima metabolomskim profiliranjem uzoraka plazme bolesnika s AB-om i ispitanika s MCI-jem ($R^2 = 0,971$; $Q^2 = 0,691$). Zdrave kontrole su označene **plavom** bojom, ispitanici s MCI-jem **crvenom**, a bolesnici s AB-om **zelenom** bojom.



Slika 30. Grafički prikaz rezultata analize OPLS-DA na podacima dobivenima metabolomskim profiliranjem uzoraka ljudske plazme metodom LC-MS u negativnom načinu ionizacije. **A)** Analiza OPLS-DA na podacima dobivenima metabolomskim profiliranjem uzoraka plazme bolesnika s AB-om i zdravih kontrolnih ispitanika ($R^2 = 0,969$; $Q^2 = 0,809$) **B)** Analiza OPLS-DA na podacima dobivenima metabolomskim profiliranjem uzoraka plazme ispitanika s MCI-jem i zdravih kontrolnih ispitanika ($R^2 = 0,966$; $Q^2 = 0,776$) **C)** Analiza OPLS-DA na podacima dobivenima metabolomskim profiliranjem uzoraka plazme bolesnika s AB-om i ispitanika s MCI-jem ($R^2 = 0,656$; $Q^2 = 0,307$). Zdrave kontrole su označene **plavom** bojom, ispitanici s MCI-jem **crvenom**, a bolesnici s AB-om **zelenom** bojom.

Većina spojeva identificiranih pomoću metode LC-MS/MS pripadali su skupinama masnih acila, glicerolipida i glicerofosfolipida. Svi ti spojevi bili su u pravilu sniženi u bolesnika oboljelih od AB-a i ispitanika s MCI-jem u usporedbi sa zdravim kontrolnim ispitanicima (Tablica 3.). Iz skupine masnih acila detektirane su i identificirane četiri masne kiseline, eikozatetraenoinska, dodekenoinska, dodekendionska te 9-hidroksioktadekadienoinska kiselina (9-HODE), koja je metabolit linolne kiseline (Tablica 3.). Navedene masne kiseline, odnosno derivati masnih kiselina, bili su značajno slabije zastupljeni u skupini ispitanika s MCI-jem u odnosu na zdrave kontrole, dok u slučaju usporedbe skupine AB sa zdravim ispitanicima, isti trend je vidljiv kod svih masnih acila, osim u slučaju dodekenoinske kiseline čija je zastupljenost u skupini AB bila višestruko povišena u odnosu na skupinu zdravih ispitanika (Tablica 3.). Također, razina ove masne

kiseline pokazala se značajno različitom pri usporedbi skupina AB i MCI, na način da je zastupljenost bila značajno viša kod ispitanika s dijagnozom AB-a (Tablica 3.). Među identificiranim glicerofosfolipidima, njih nekoliko pokazalo je značajno različitu zastupljenost u skupini ispitanika s MCI-jem u odnosu na osobe s dijagnozom AB-a (Tablica 3.). Iz rezultata je vidljivo da su kod ispitanika s AB-om pojedini fosfatidilkolini (PC) te njihove derivati lizolektini (LysoPC), koji nastaju nakon cijepanja jednog repa masne kiseline fosfolipazom, značajno sniženi u odnosu na zdrave kontrolne ispitanike (Tablica 3.). Ove molekule najzastupljeniji su fosfolipidi u stanicama i sastavni dio njihovih membrana. Isti trend je vidljiv i u slučaju dva fosfatidiletanolamina (PE), LysoPE(18:0) i LysoPE(18:1) (Tablica 3.). Fosfolipidi iz skupine PE ključni su za strukturu staničnih membrana, sudjeluju u zgrušavanju krvi te transportu lipida. Među navedenim fosfolipidima detektiran je i jedan fosfatidilinozitol (PI), PI(18:0/22:0), čija je zastupljenost bila značajno niža kod bolesnika s AB-om u odnosu na zdrave kontrole (Tablica 3.). Svi ovi fosfolipidi bili su značajno slabije eksprimirani i kod osoba s MCI-jem u odnosu na zdravu kontrolu, a usporedbom bolesnika s AB-om i onih s dijagnozom MCI-ja vidljivo je da su navedeni fosfolipidi slabije zastupljeni kod osoba s AB-om u odnosu na pojedince kod kojih je neurokognitivno oštećenje blago (skupina MCI). Od navedenih, jedino LysoPC(14:0) nije dosegao razinu značajnosti pri usporedbi između skupina AB i MCI (Tablica 3.). U analizi su detektirana i identificirana tri monoacilglicerola (MG) (Tablica 3.). Ovi metaboliti bili su značajno slabije eksprimirani kod ispitanika s MCI-jem u odnosu na kontrolne ispitanike, a pri usporedbi ispitanika s AB-om i kontrola, samo MG(0:0/18:0/0:0) zadržao je statističku značajnost (Tablica 3.). Međutim, iz rezultata je vidljivo da je kod svih detektiranih MG u slučaju skupine s AB-om prisutan sličan trend kao i kod usporedbe ispitanika s MCI-jem u odnosu na kontrolne ispitanike. U slučaju usporedbe skupina AB i MCI, nije bilo značajne razlike u zastupljenosti identificiranih lipida MG. Metabolit biliverdin je bio značajno povišen, a bilirubin značajno snižen u skupinama s kognitivnim oštećenjem (AB i MCI) u usporedbi sa zdravim kontrolnim ispitanicima (Tablica 3.). LC-MS analizom identificiran je i multifunkcionalni steroid, DHEAS, koji je bio slabije zastupljen u skupini bolesnika s AB-om ili MCI-jem u odnosu na zdrave ispitanike, dok razlika između skupina AB i MCI nije utvrđena.

Tablica 3. Značajno promijenjeni metaboliti u uzorcima ljudske plazme, detektirani metodom LC-MS/MS u pozitivnom i negativnom načinu ionizacije, između bolesnika oboljelih od AB-a, ispitanika s MCI-jem i zdravih kontrola.

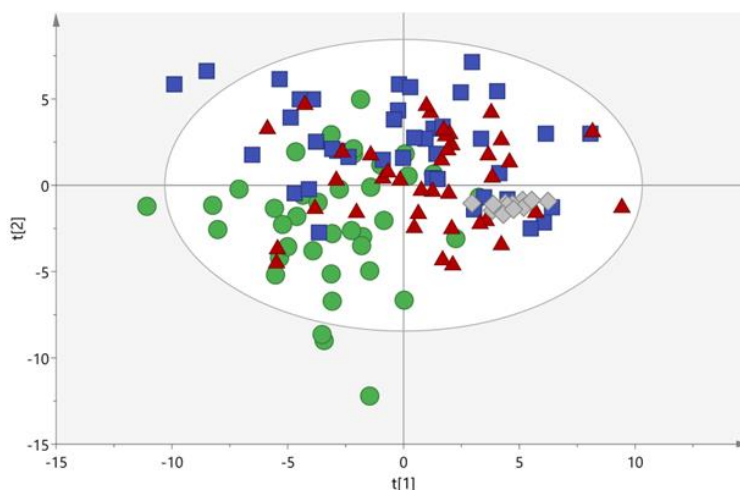
Zdrave kontrole vs. AB								Kontrola vs. MCI				MCI vs. AB			
Metaboliti	m/z	RT	ESI	P*	p(BH)	%Δ	VIP	P*	p(BH)	%Δ	VIP	P*	p(BH)	%Δ	VIP
MASNI ACILI															
Eikozatetraenoinjska kiselina	180.15	29.91	+	8.56E-03	6.35E-03	-32.4%	<1.00	4.17E-04	1.43E-02	-34.3%	1.39	NS	NS	3.0%	<1.00
Dodekenoinjska kiselina	228.14	8.14	+	4.05E-03	2.05E-04	713.4%	2.88	1.64E-03	1.48E-02	-41.3%	1.23	NS	7.89E-05	1285.8%	2.28
Dodekenedioinska kiselina	304.24	27.83	+	2.50E-05	2.08E-02	-20.8%	<1.00	1.77E-03	6.80E-03	-30.7%	1.33	2.02E-07	NS	14.2%	<1.00
9-HODE	296.23	18.71	-	1.21E-05	1.14E-04	-87.1%	1.30	1.08E-07	6.69E-06	-96.2%	2.04	NS	NS	240.4%	<1.00
GLICEROLIPIDI															
MG(18:2/0:0/0:0)	330.27	28.23	+	2.53E-04	2.77E-04	-29.1%	<1.00	1.08E-07	6.69E-06	-39.6%	1.67	NS	NS	17.4%	<1.00
MG(16:0/0:0/0:0)	354.27	25.74	+	3.98E-05	1.04E-03	-40.0%	<1.00	1.38E-07	2.26E-05	-51.6%	1.81	NS	NS	24.0%	<1.00
MG(0:0/18:1/0:0)	356.29	28.93	+	5.67E-06	9.02E-05	-47.9%	1.14	5.49E-07	6.68E-06	-53.6%	1.71	NS	NS	12.1%	<1.00
GLICEROFOSFOLIPIDI															
PC(14:0/O-1:0)	513.31	15.20	-	1.25E-05	6.46E-05	-48.4%	1.37	5.62E-03	4.23E-02	-31.4%	1.21	NS	NS	-24.8%	1.38
PC(O-16:0/3:0)	465.32	24.47	+	6.23E-06	4.48E-05	-42.4%	1.14	2.08E-03	3.49E-03	-31.5%	1.46	NS	NS	-15.9%	1.31
PC(O-1:0/16:0)	467.30	14.42	+	9.49E-06	9.98E-05	-51.0%	1.49	4.25E-03	4.13E-02	-33.1%	1.34	NS	NS	-26.8%	1.03
PC(O-12:0/2:0)	509.35	19.97	+	5.94E-06	1.19E-04	-43.4%	1.17	9.08E-03	2.47E-02	-29.7%	1.30	1.24E-02	NS	-19.4%	1.18
LysoPC(14:0)	521.35	20.69	+	4.15E-06	4.84E-06	-51.8%	1.40	7.61E-03	4.90E-05	-47.5%	1.78	1.17E-02	NS	-8.2%	<1.00
LysoPC(14:0)	513.31	14.45	-	6.53E-06	7.00E-05	-46.8%	1.36	9.62E-03	4.54E-02	-30.0%	1.19	3.19E-02	NS	-24.0%	1.33
LysoPC(P-15:0)	539.32	16.81	-	1.38E-06	6.33E-05	-42.2%	1.44	1.45E-04	4.80E-02	-23.8%	1.19	1.66E-02	NS	-24.1%	1.58
LysoPC(18:1)	567.35	20.72	-	1.05E-07	1.78E-06	-52.9%	1.59	1.45E-06	3.33E-04	-43.0%	1.77	NS	NS	-17.4%	1.38
LysoPE(18:0)	467.30	15.18	+	8.02E-09	6.69E-05	-50.7%	1.49	1.31E-06	2.99E-02	-35.4%	1.38	2.50E-02	NS	-23.7%	1.02
LysoPC(15:0)	537.38	25.72	+	4.68E-06	9.72E-05	-42.2%	1.27	4.82E-03	1.61E-02	-27.8%	1.37	4.14E-02	NS	-20.0%	1.29
LysoPC(16:1)	463.31	21.09	-	3.87E-06	9.24E-07	-42.6%	1.66	9.90E-03	5.83E-05	-33.7%	1.83	1.14E-02	NS	-13.4%	1.17
LysoPE(18:1)	481.32	17.15	+	2.23E-07	1.41E-04	-43.7%	1.14	6.53E-06	2.96E-02	-28.4%	1.37	NS	NS	-21.4%	1.26
PI(18:0/22:0)	958.63	20.16	-	1.01E-06	3.13E-05	-47.8%	1.36	4.33E-04	5.01E-03	-33.3%	1.41	1.65E-02	NS	-21.7%	1.01
ORGANOHETEROCIKLIČKI SPOJEVI															
Biliverdin	584.26	34.16	+	5.15E-05	3.55E-04	262.0%	3.37	2.44E-04	4.93E-03	345.3%	1.35	NS	NS	-18.7%	<1.00
Bilirubin	582.25	13.26	+	5.60E-05	3.40E-04	-61.5%	2.17	2.60E-04	4.85E-03	-62.8%	1.15	NS	NS	3.4%	<1.00
STEROLNI LIPIDI															
Dehidroepiandrosteron sulfat	368.17	7.27	-	2.37E-03	6.04E-03	-46.8%	<1.00	9.71E-04	9.43E-03	-52.0%	1.25	NS	NS	10.7%	<1.00

AB – Alzheimerova bolest, MCI – blagi neurokognitivni poremećaj, MG -monoacilglicerol, PC – fosfatidilkolin, PE – fosfatidiletanolamin, PI – fosfatidilinozitol, pBH – p – vrijednost nakon Benjamini–Hochbergove korekcije (p vrijednosti dobivena t-testom ili Mann-Whitney U testom) , p* - razina statističke značajnosti dobivena ANOVA ili Kruskal-Wallis ANOVA testom, RT – vrijeme zadržavanja, VIP – vrijednost važnosti varijable u projekciji dobivena iz modela OPLS-DA, %Δ – postotak promjene, 9-HODE - 9-hidroksioktadekadienoinjska kiselina (zeleno – pozitivan smjer promjene, crveno – negativan smjer promjene).

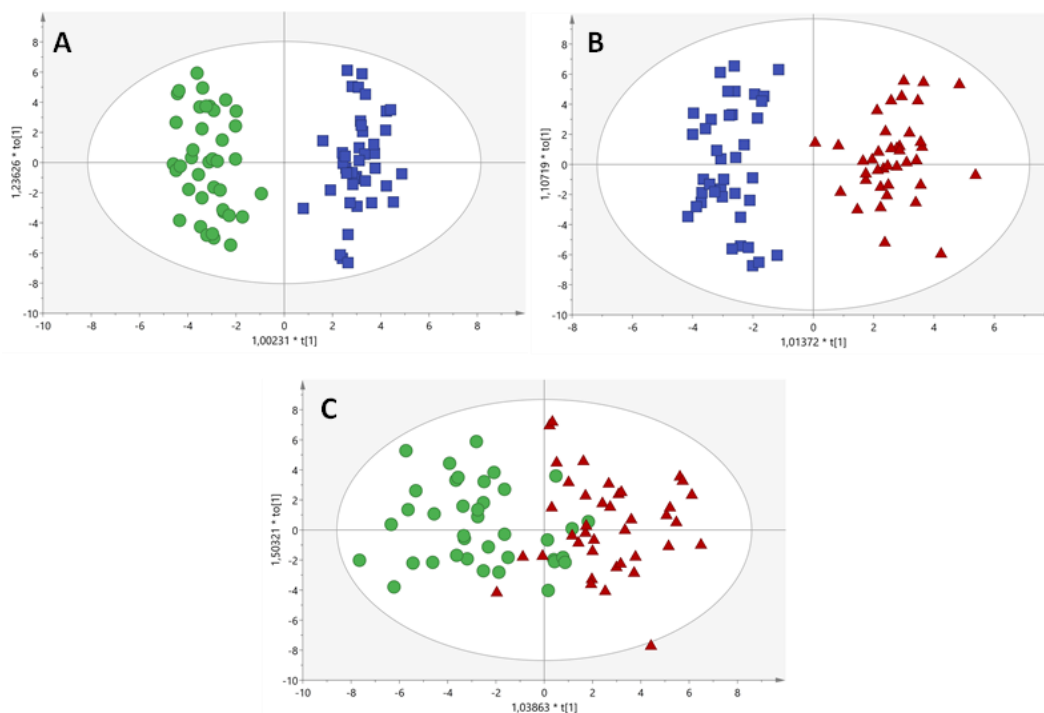
3.4.3. Metabolomsko profiliranje metodom GC-MS

Analizom uzoraka ljudske plazme metodom GC-MS ukupno je detektirano 88 metabolita. Nakon normalizacije prvobitnih podataka, statističke analize i identifikacije metabolita, ukupno 27 metabolita detektiranih metodom GC-MS bilo je značajno promijenjeno između bolesnika s AB-om, ispitanika s MCI-jem i zdravih kontrolnih ispitanika.

Graf dobiven metodom PCA pokazuje dobro razdvajanje zdravih kontrolnih ispitanika i bolesnika s AB-om, pri čemu su ispitanici s MCI-jem smješteni između ovih dviju skupina (Slika 31.). Uzorci QC dobro se grupiraju zajedno, što ukazuje na analitičku pouzdanost metode (Slika 31.). Nakon analize PCA, generiran je model metodom OPLS-DA koji pokazuje jasno razdvajanje između dviju uspoređivanih skupina uzoraka: skupine AB i zdravih kontrola, zdravih kontrola i skupine MCI te skupine ispitanika s AB-om i onih s dijagnozom MCI-ja (Slika 32.).



Slika 31. Grafički prikaz rezultata analize PCA ($R^2X(\text{cum}) = 0,753$) na podacima dobivenima metabolomskim profiliranjem uzoraka ljudske plazme metodom GC-MS. Metodom GC-MS analizirani su uzorci plazmi zdravih kontrolnih ispitanika, ispitanika s MCI-jem te bolesnika oboljelih od AB-a. Zdrave kontrole su označene **plavom** bojom, ispitanici s MCI-jem **crvenom**, bolesnici s AB-om **zelenom**, a uzorci QC **sivom** bojom.



Slika 32. Grafički prikaz rezultata analize OPLS-DA na podacima dobivenima metabolomskim profiliranjem uzoraka ljudske plazme metodom GC-MS. **A)** Analiza OPLS-DA na podacima dobivenima metabolomskim profiliranjem uzoraka plazme bolesnika s AB-om i zdravih kontrolnih ispitanika ($R^2 = 0,934$; $Q^2 = 0,869$) **B)** Analiza OPLS-DA na podacima dobivenima metabolomskim profiliranjem uzoraka plazme ispitanika s MCI-jem i zdravih kontrolnih ispitanika ($R^2 = 0,884$; $Q^2 = 0,851$) **C)** Analiza OPLS-DA na podacima dobivenima metabolomskim profiliranjem uzoraka plazme bolesnika s AB-om i ispitanika s MCI-jem ($R^2 = 0,600$; $Q^2 = 0,335$). Zdrave kontrole su označene **plavom** bojom, ispitanici s MCI-jem **crvenom**, a bolesnici s AB-om **zelenom** bojom.

Spojevi detektirani metodom GC-MS pripadali su skupinama benzena i supstituiranih derivata, karboksilnih kiselina i njihovih derivata, masnih acila, hidroksi i keto kiselina te organooksigenih spojeva (Tablica 4.). Nadalje, dobiveni rezultati upućuju na niže razine aminokiselina i njihovih derivata (prolin, valin, glicin, serin, treonin, piroglutaminska kiselina, glutaminska kiselina) u bolesnika s AB-om u usporedbi sa zdravim kontrolnim ispitanicima i ispitanicima s MCI-jem (Tablica 4.). Zastupljenost valina, sukscinske kiseline i glutaminske kiseline također je bila snižena u ispitanika s MCI-jem u usporedbi sa zdravim kontrolama, ali je bila povišena u odnosu na bolesnike s AB-om (Tablica 4.). Limunska kiselina bila je manje zastupljena u ispitanika s AB-om i MCI-jem u usporedbi sa zdravim ispitanicima, međutim, razina ovog metabolita nije se razlikovala između skupina AB i MCI (Tablica 4.). Metaboliti koji spadaju u skupinu hidroksi kiselina (jabučna kiselina, glikolna kiselina i 3-hidroksipropanonska kiselina) bile su snižene u bolesnika s

AB-om u odnosu na ispitanike s dijagnozom MCI-ja, pri čemu je vidljivo da se razine jabučne kiseline smanjuju s napredovanjem kognitivnog propadanja (od zdravih kontrolnih ispitanika, preko ispitanika s MCI-jem, do bolesnika s AB-om). 2-ketoizokaproična kiselina je bila snižena u ispitanika s MCI-jem i AB-om u odnosu na zdrave kontrole, ali nije utvrđena razlika u razinama ovog metabolita između skupine AB i MCI (Tablica 4.). Različiti organooksigeni spojevi, uključujući glicerinsku kiselinu, fruktozu i glukozaminsku kiselinu, pokazali su niže razine u skupini AB u odnosu na zdrave kontrole i ispitanike s MCI-jem (Tablica 4.). Razine fruktoze su bile značajno niže u skupini MCI u odnosu na kontrolnu skupinu, uz dodatno smanjenje razine prema dijagnozi AB-a. Razine ugljikohidrata maltoze i izomaltoze bile su više u skupinama AB i MCI u odnosu na kontrolnu skupinu, dok je razina ovih disaharida bila niža u bolesnika s AB-om u odnosu na one s dijagnozom MCI-ja.

Tablica 4. Značajno promijenjeni metaboliti u uzorcima ljudske plazme, detektirani metodom GC-MS, između bolesnika oboljelih od AB-a, ispitanika s MCI-jem i zdravih kontrola.

Zdrave kontrole vs. AB						Zdrave kontrole vs. MCI				MCI vs. AB			
Metaboliti	RT	P*	p(BH)	%Δ	VIP	P*	p(BH)	%Δ	VIP	P*	p(BH)	%Δ	VIP
HIDROKSI KISELINE I DERIVATI													
Glikolna kiselina	7.03	2.37E-07	9.75E-08	-26.8	1.53	NS	NS	1.4	1.07	1.92E-08	2.00E-08	-27.8	1.99
3-hidroksipropanska kiselina	8.02	1.88E-06	6.59E-07	-25.5	1.49	NS	NS	0.4	1.11	8.98E-07	1.62E-05	-25.8	1.83
Jabučna kiselina	12.69	5.13E-09	1.36E-10	-42.8	1.71	1.16E-03	6.94E-04	-20.7	1.50	4.23E-06	2.00E-05	-27.8	1.66
AMINOKISELINE, PEPTIDI I ANALOZI													
Serin	11.04	2.29E-03	7.32E-03	-20.3	<1.00	NS	NS	-0.9	<1.00	1.17E-02	3.26E-02	-19.6	1.20
2-aminomalonska kiselina	12.48	NS	NS	-6.6	<1.00	NS	NS	23.0	<1.00	3.37E-03	1.25E-02	-24.1	1.35
4-hidroksiprolin	13.18	NS	NS	-9.4	<1.00	NS	2.56E-02	34.4	<1.00	5.20E-03	1.72E-02	-32.5	1.06
Alanin	7.43	4.04E-02	NS	-17.7	<1.00	NS	NS	4.4	<1.00	1.21E-02	3.26E-02	-21.1	1.00
Glutaminska kiselina	13.28	1.03E-10	1.35E-09	-63.3	1.73	3.61E-07	1.71E-08	-55.1	1.72	5.04E-03	1.72E-02	-18.3	<1.00
Metionin	13.11	NS	NS	-8.0	<1.00	NS	NS	11.9	<1.00	2.47E-02	2.24E-02	-17.7	1.02
Piroglutaminska kiselina	13.14	3.41E-03	3.24E-03	-21.4	1.00	NS	NS	5.2	<1.00	1.98E-04	3.49E-04	-25.3	1.59
Valin	9.05	2.72E-04	3.82E-04	-23.8	1.00	2.91E-02	2.03E-02	-16.1	1.03	NS	NS	-9.1	<1.00
Glicin	10.32	2.71E-05	1.43E-04	-35.7	1.30	NS	NS	9.1	<1.00	4.25E-06	2.02E-05	-41.0	1.63
Prolin	8.59	2.87E-03	8.86E-03	-30.0	1.05	NS	NS	-16.3	<1.00	1.76E-02	4.49E-02	-16.4	1.08
Treonin	11.37	4.65E-04	9.30E-04	-25.7	1.03	NS	NS	-2.8	<1.00	2.07E-03	1.89E-03	-23.5	1.34
BENZENI I SUPSTITUIRANI DERIVATI													
Benzoična kiselina	9.55	NS	NS	6.6	<1.00	1.32E-04	2.20E-05	-27.2	1.03	7.45E-05	4.46E-04	46.4	<1.00
Hipurna kiselina	16.91	NS	NS	3.8	<1.00	7.99E-05	1.31E-05	19.2	1.45	5.81E-04	7.97E-04	-12.9	1.53
UGLJIKOHIDRATI													
Arabinoza	14.78	NS	NS	-3.1	1.01	NS	NS	6.9	1.32	7.43E-03	2.29E-02	-9.4	1.19
Fruktoza	17.05	1.83E-05	1.03E-04	-38.5	1.12	4.91E-02	1.38E-02	-32.9	1.09	4.19E-03	1.50E-02	-8.4	1.14
Glukoza	17.34	2.35E-02	NS	-3.8	1.03	NS	NS	1.0	1.18	1.05E-02	3.02E-02	-4.8	1.02
Glukozaminska kiselina	18.37	1.40E-06	9.05E-06	-26.7	1.46	NS	NS	-0.4	1.04	1.55E-06	2.00E-05	-26.4	1.91
Glicerinska kiselina	10.63	4.13E-11	1.14E-12	-40.5	1.83	NS	NS	-8.6	1.11	1.53E-08	2.00E-08	-34.9	2.04
Izomaltoza	25.55	2.15E-03	1.00E-02	12.1	1.18	1.10E-06	9.77E-08	24.8	1.85	2.69E-03	1.10E-02	-10.2	1.19
Maltoza	24.60	5.26E-08	4.33E-07	36.5	1.55	1.86E-09	4.08E-11	52.2	2.02	1.91E-02	4.60E-02	-10.3	1.11
KARBOKSILNE KISELINE													
Sukcinska kiselina	10.42	5.10E-09	6.16E-12	-45.3	1.75	2.50E-06	8.52E-07	-30.8	1.65	8.39E-04	1.42E-03	-20.9	1.43
Limunska kiselina	16.52	3.94E-03	1.14E-02	-10.9	1.09	4.91E-02	1.38E-02	-4.0	1.17	NS	NS	-7.2	<1.00
KRATKOLANČANE KETO KISELINE													
2-ketoizokaproična kiselina	9.00	6.92E-04	2.58E-03	-26.3	1.11	1.32E-03	2.65E-04	-28.1	1.38	NS	NS	2.5	<1.00
Acetoacetat	7.86	1.12E-04	4.56E-04	75.1	1.14	6.65E-04	1.19E-04	76.4	<1.00	NS	NS	-0.7	<1.00

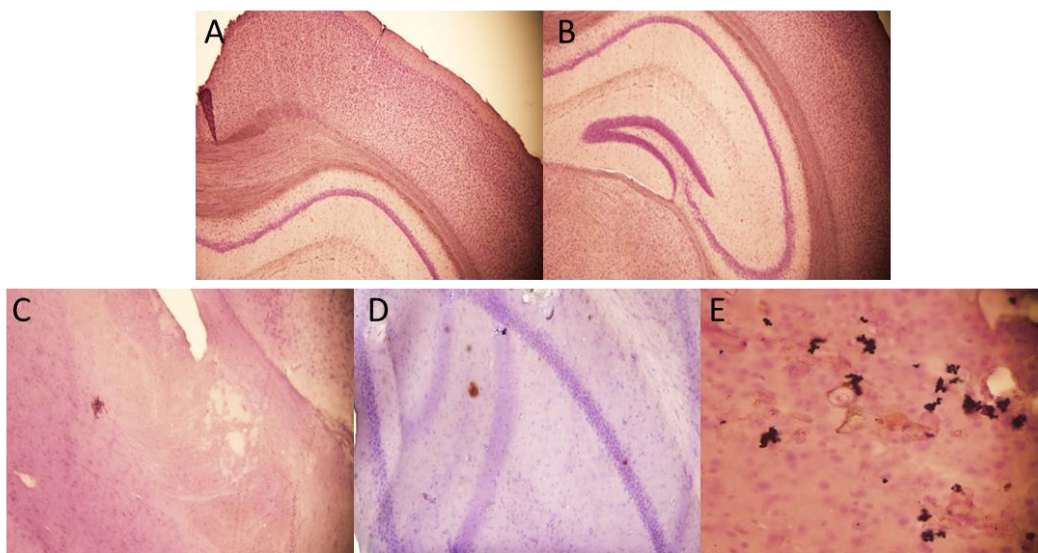
AB – Alzheimerova bolest, MCI – blagi neurokognitivni poremećaj, pBH – p – vrijednost nakon Benjamini–Hochbergove korekcije (p vrijednosti dobivena t-testom ili Mann-Whitney U testom), p* - razina statističke značajnosti dobivena ANOVA ili Kruskal-Wallis ANOVA testom, RT – vrijeme zadržavanja, VIP – vrijednost važnosti varijable u projekciji dobivena iz modela OPLS-DA, %Δ – postotak promjene (zeleno – pozitivan smjer promjene, crveno – negativan smjer promjene).

3.5. Animalni model

3.5.1. Potvrda animalnog modela AB-a

A β -42 imunohistokemija

Imunohistokemijskom metodom, primjenom protutijela za detekciju A β -42, utvrđena je prisutnost amiloidnih plakova u analiziranim moždanim prerezima (Slika 33.). Amiloidne nakupine nisu uočene na prerezima mozga kontrolnih miševa (Slika 33., A i B), dok su na prerezu mozga miševa 3xTg-AD vidljive nakupine u tkivu hipokampusa i prefrontalnog korteksa (Slika 33., C-E).



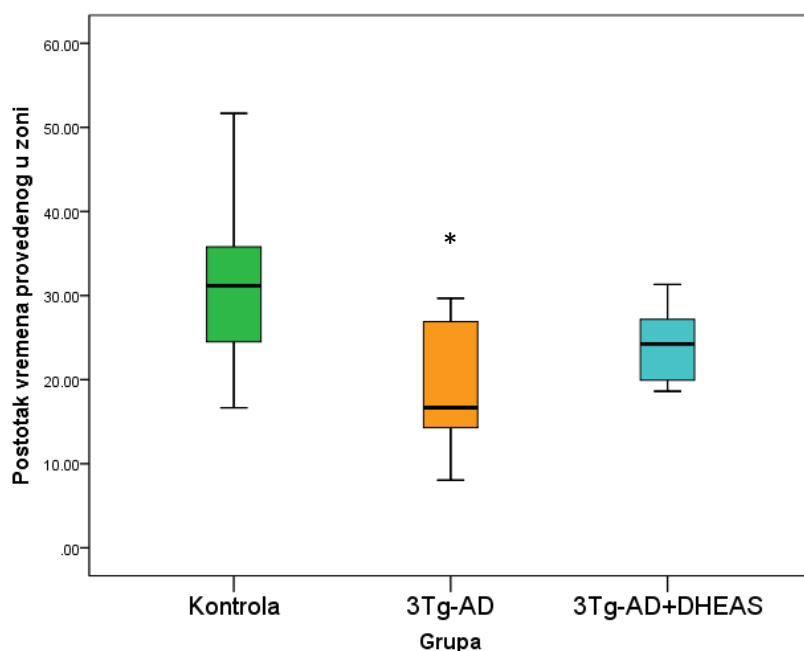
Slika 33. Imunohistokemijska vizualizacija nakupina amiloida (A β -42) u mozgu miševa 3xTg-AD. **A) i B)** Prerez hipokampusa (debljine 30 μ m) miša iz kontrolne skupine koja nema patologiju koja odgovara AB-u. **C), D) i E)** Prerez hipokampusa (debljine 30 μ m) miševa 3xTg-AD s razvijenom patologijom koja odgovara AB-u.

Ponašanje životinja

Kognitivne sposobnosti miševa procijenjene su testovima MWM, Y-labirinta i SDT kako bi se dodatno potvrdila adekvatnost animalnog modela AB-a.

U testu MWM analiziran je postotak vremena provedenog u zoni u kojoj se nalazila skrivena platforma kao način procjene radne memorije. Rezultati usporedbe pokazali su da postoji statistički značajna razlika između ispitivanih skupina ($H = 7,60$; $p = 0,022$;

Kruskal-Wallis H test). Za međusobne usporedbe skupina primijenjen je dodatno Mann-Whitney U test uz Bonferroni korekciju za višestruke usporedbe (prag značajnosti $p < 0,0167$). Rezultati su pokazali smanjeni postotak vremena provedenog u zoni u kojoj se tijekom treninga nalazila platforma u usporedbi s kontrolnom skupinom, što upućuje na narušenu radnu memoriju kod miševa 3xTg-AD ($U = 29,00$; $p = 0,010$; Mann-Whitney U test) (Slika 34.).



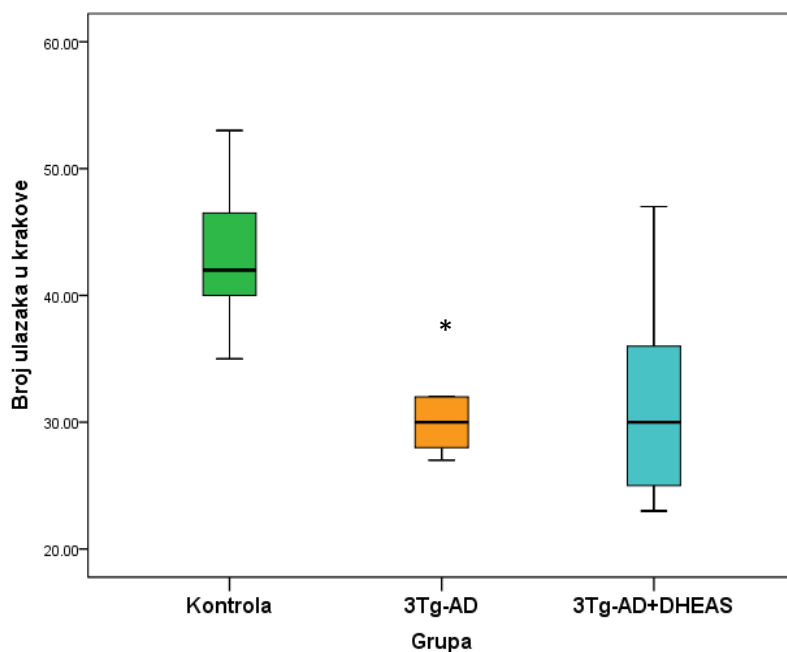
Slika 34. Usporedba rezultata testa ponašanja MWM između kontrolne skupine, miševa 3Tg-AD te miševa 3xTg-AD koji su primali terapiju lijekom DHEAS ($H = 7,60$; $p = 0,022$; Kruskal-Wallis H test)). Na y-osi prikazan je postotak vremena (%) provedenog u zoni u kojoj se prethodno nalazila platforma.

Središnji pravokutnik predstavlja vrijednosti od donjeg do gornjeg kvartila (od 25. do 75. percentile), a središnja linija predstavlja medijan. Horizontalne linije se pružaju od minimalne do maksimalne vrijednosti.

* $p = 0,010$ (vs kontrolna skupina; post-hoc test)

U testu Y-labirinta analiziran je postotak spontanijih alternacija kao mjera prostorne radne memorije te broj ulazaka u krakove kao pokazatelj lokomotorne aktivnosti. Analiza broja ulazaka u krakove, pokazala je statistički značajnu razliku između skupina ($H = 11,58$; $p = 0,003$; Kruskal-Wallis H test). Za međusobne usporedbe skupina primijenjen je dodatno Mann-Whitney U test uz Bonferroni korekciju za višestruke usporedbe (prag značajnosti $p < 0,0167$). Rezultati su pokazali da su kontrolni miševi imali značajno veći broj ulazaka

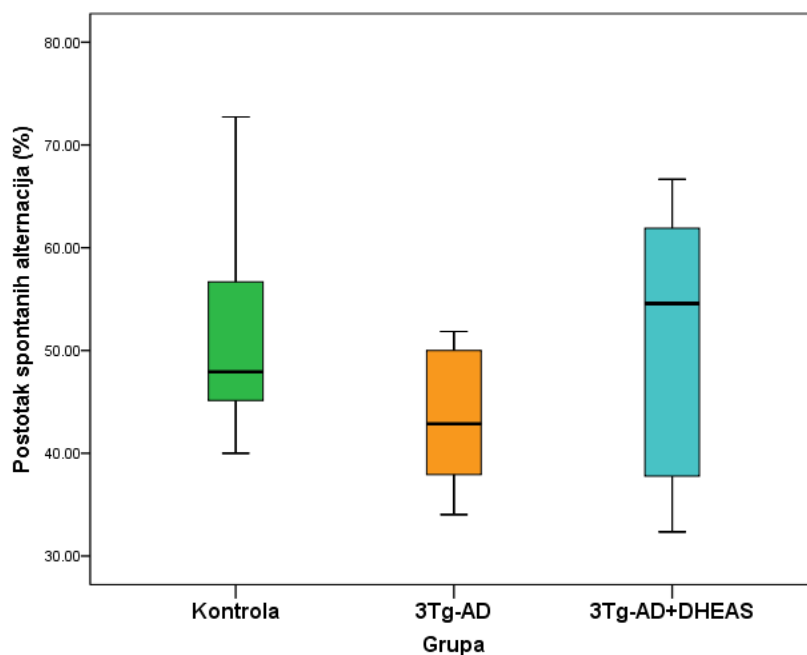
u krakove u usporedbi s miševima 3xTg-AD miševima ($U = 0,00$; $p = 0,001$; Mann-Whitney U test), što upućuje na smanjenu lokomotornu aktivnost miševa 3xTg-AD (Slika 35.). Suprotno tome, analiza postotka spontanijih alternacija (Slika 36.), nije pokazala statistički značajne razlike između ispitivanih skupina ($H = 3,25$; $p = 0,197$; Kruskal-Wallis H test).



Slika 35. Usporedba broja ulazaka u krakove Y-labirinta između kontrolne skupine, miševa 3xTg-AD te miševa 3xTg-AD koji su primali terapiju lijekom DHEAS ($H = 11,58$; $p = 0,003$; Kruskal-Wallis H test).

Središnji pravokutnik predstavlja vrijednosti od donjeg do gornjeg kvartila (od 25. do 75. percentile), a središnja linija predstavlja medijan. Horizontalne linije se pružaju od minimalne do maksimalne vrijednosti.

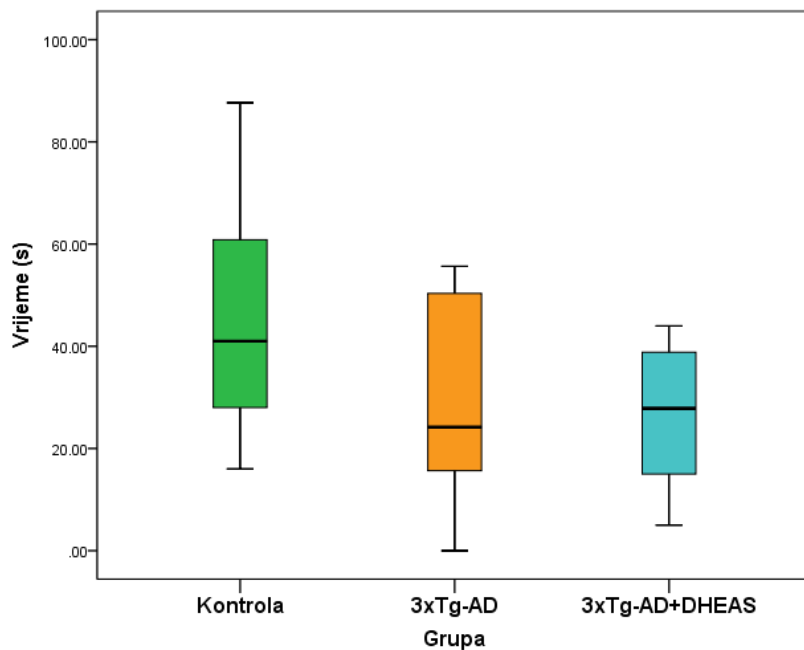
* $p = 0,001$ (vs. kontrolna skupina; post-hoc test)



Slika 36. Usporedba postotka spontanijh alternacija u Y-labirintu između kontrolne skupine, miševa 3xTg-AD te miševa 3xTg-AD koji su primali terapiju lijekom DHEAS ($H = 3,25$; $p = 0,197$; Kruskal-Wallis H test).

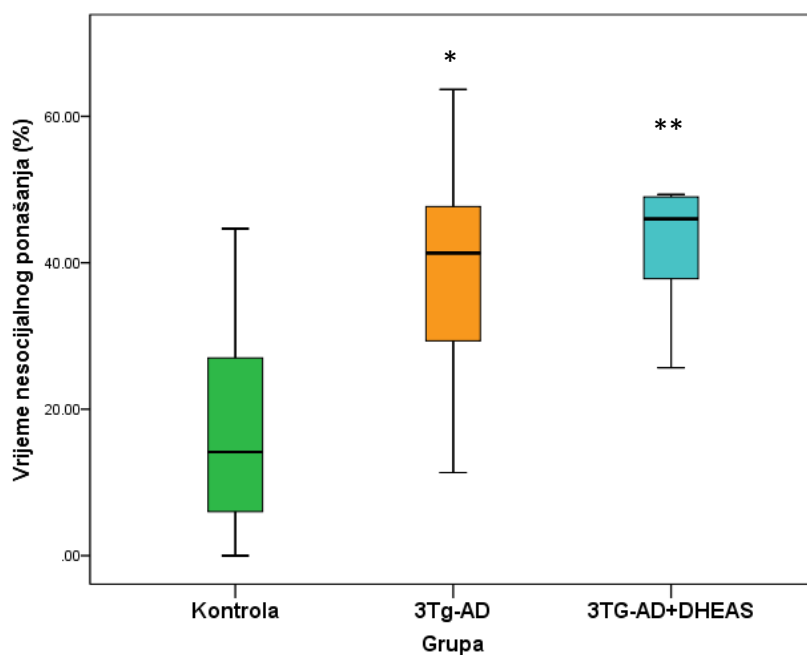
Središnji pravokutnik predstavlja vrijednosti od donjeg do gornjeg kvartila (od 25. do 75. percentile), a središnja linija predstavlja medijan. Horizontalne linije se pružaju od minimalne do maksimalne vrijednosti.

U testu SDT analizirano je vrijeme koje su životinje provele istražujući novu, nepoznatu životinju kao mjera socijalnog ponašanja. Usporedba nije pokazala značajnu razliku između ispitivanih skupina ($H = 4,65$; $p = 0,098$; Kruskal-Wallis H test), iako je na grafičkom prikazu (Slika 37.) vidljiv trend smanjenog vremena istraživanja kod miševa 3xTg-AD u usporedbi s kontrolnim životinjama. Suprotno tome, analiza vremena provedenog u nesocijalnom ponašanju pokazala je statistički značajnu razliku između skupina ($H = 16,01$; $p < 0,001$; Kruskal-Wallis H test). Za međusobne usporedbe skupina primijenjen je dodatno Mann-Whitney U test uz Bonferroni korekciju za višestruke usporedbe (prag značajnosti $p < 0,0167$). Rezultati su pokazali povećano vrijeme nesocijalnog ponašanja kod miševa 3xTg-AD ($U = 31,00$; $p = 0,003$; Mann-Whitney U test) i 3xTg-AD+DHEAS ($U = 11,00$; $p = 0,001$; Mann-Whitney U test). u usporedbi s kontrolnim miševima (Slika 38.).



Slika 37. Usporedba rezultata testa ponašanja SDT između kontrolne skupine, miševa 3xTg-AD te miševa 3xTg-AD koji su primali terapiju lijekom DHEAS ($H = 5,63$; $p = 0,098$; Kruskal-Wallis H test). Na y-osi prikazano je vrijeme (s) koje su životinje provele istražujući novu, nepoznatu životinju.

Središnji pravokutnik predstavlja vrijednosti od donjeg do gornjeg kvartila (od 25. do 75. percentile), a središnja linija predstavlja medijan. Horizontalne linije se pružaju od minimalne do maksimalne vrijednosti.



Slika 38. Usporedba rezultata nesocijalnog ponašanja (test SDT) između kontrolne skupine, miševa 3xTg-AD te miševa 3xTg-AD koji su primali terapiju lijekom DHEAS ($H = 16,01$; $p < 0,001$; Kruskal-Wallis H test).

Središnji pravokutnik predstavlja vrijednosti od donjeg do gornjeg kvartila (od 25. do 75. percentile), a središnja linija predstavlja medijan. Horizontalne linije se pružaju od minimalne do maksimalne vrijednosti.

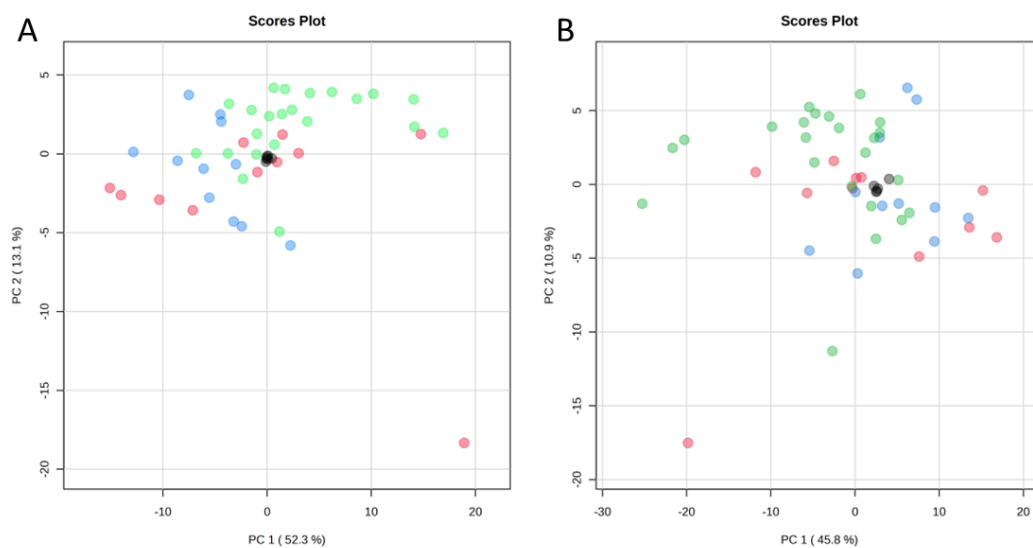
* $p = 0,003$ (vs. kontrolna skupina; Mann-Whitney U test)

** $p = 0,001$ (vs. Kontrolna skupina; Mann-Whitney U test)

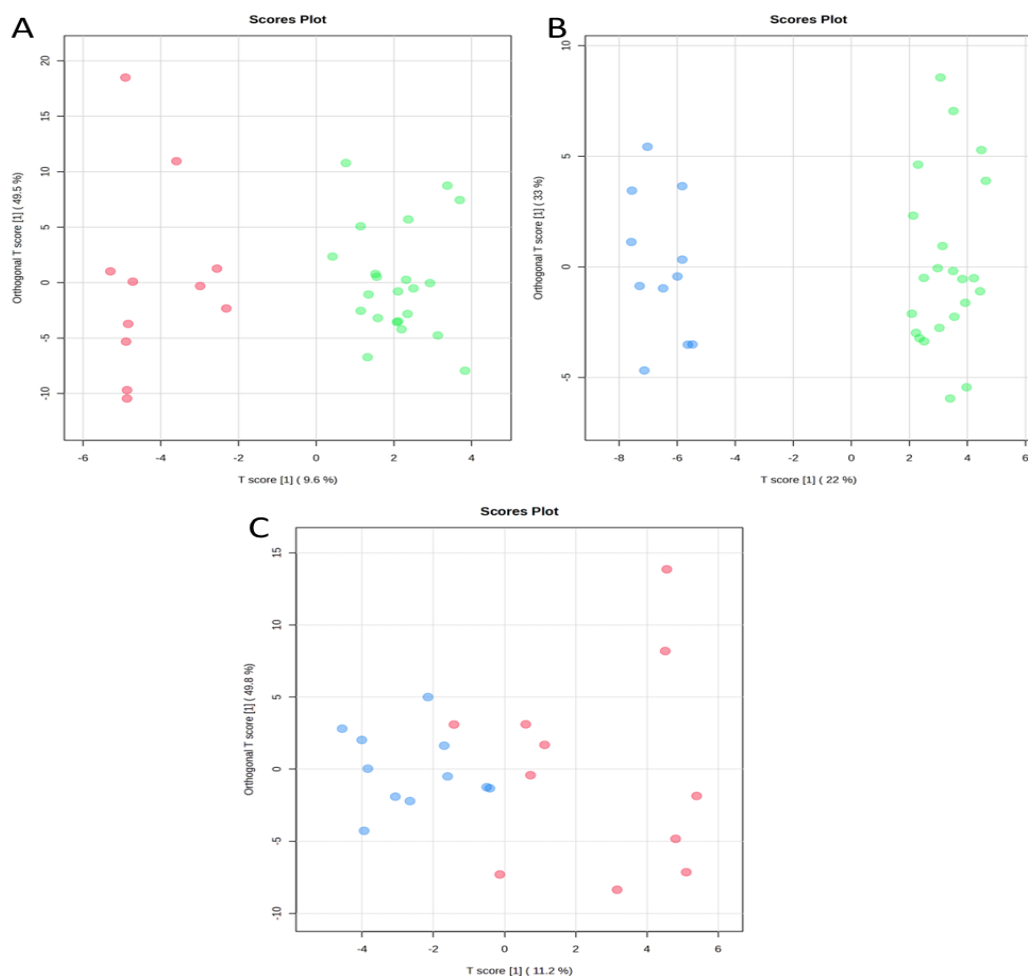
3.5.2. Metabolomsko profiliranje uzoraka plazme metodom LC-MS

Metodom LC-MS analizirane su mišje plazme i detektirano je 236 spojeva u pozitivnom i 174 u negativnom načinu ionizacije. Nakon normalizacije podataka i provedene multivarijatne i univarijatne statističke obrade, ukupan broj tentativno identificiranih metabolita detektiranih u pozitivnom načinu ionizacije bio je 14, a u negativnom 12. Identificirani metaboliti pripadali su skupinama aminokiselina i peptida, masnih acila, glicerofosfolipida i indola (Tablica 5.).

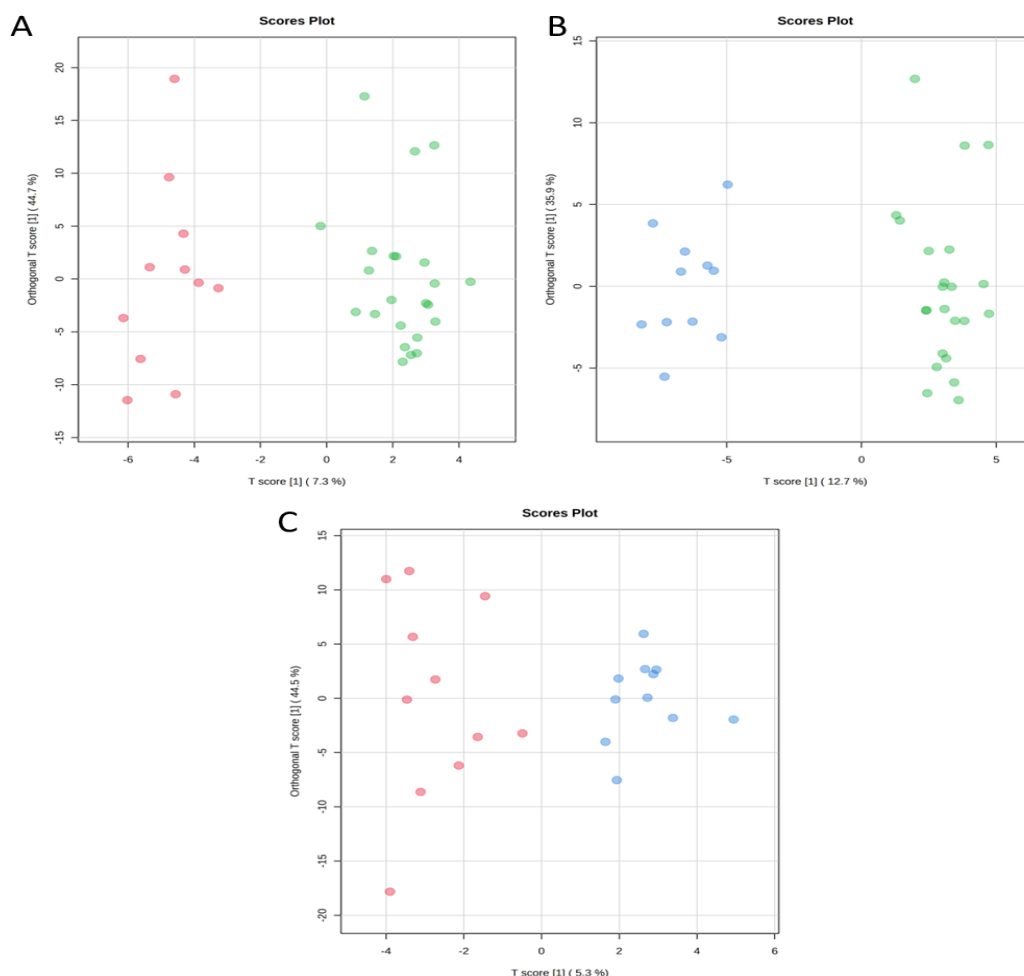
Za oba načina ionizacije generiran je grafički prikaz razdvajanja pojedinih životinja metodom PCA koji pokazuje slabije razdvajanje između ispitivanih skupina, dok uzorci QC pokazuju dobru grupaciju, osobito nakon normalizacije (Slika 39., A i B). Međutim, nakon generiranja modela OPLS-DA za podatke dobivene pozitivnim i negativnim načinom ionizacije, uočeno je znatno bolje razdvajanje između ispitivanih skupina: kontrolnih miševa i miševa 3xTg-AD, kontrolnih miševa i miševa 3xTg-AD tretiranih lijekom DHEAS te miševa 3xTg-AD koji nisu i onih koji jesu tretirani lijekom DHEAS (Slika 40. i 41.).



Slika 39. Grafički prikaz rezultata analize PCA na podacima dobivenima metabolomskim profiliranjem uzoraka mišje plazme metodom LC-MS. Metodom LC-MS analizirani su uzorci plazmi kontrolnih miševa 3xTg(+/+), 3xTg-AD miševa i 3xTg-AD miševa tretiranih lijekom DHEAS. **A)** Neciljano metabolomsko profiliranje metodom LC-MS u pozitivnom načinu ionizacije; **B)** Neciljano metabolomsko profiliranje metodom LC-MS u negativnom načinu ionizacije. Miševi 3xTg-(+/+) su označeni zelenom bojom, 3xTg-AD crvenom, a miševi 3xTg-AD+DHEAS plavom, a QC uzorci sivom bojom.



Slika 40. Grafički prikaz rezultata analize OPLS-DA na podacima dobivenima metabolomskim profiliranjem uzoraka mišje plazme metodom LC-MS u pozitivnom načinu ionizacije. **A)** Analiza OPLS-DA na podacima dobivenima metabolomskim profiliranjem uzoraka plazme kontrolnih 3xTg-(+/+) i miševa 3xTg-AD **B)** Analiza OPLS-DA na podacima dobivenima metabolomskim profiliranjem uzoraka plazme kontrolnih miševa 3xTg-(+/+) i miševa 3xTg-AD tretiranih lijekom DHEAS **C)** Analiza OPLS-DA na podacima dobivenima metabolomskim profiliranjem uzoraka plazme miševa 3xTg-AD i miševa 3xTg-AD tretiranih lijekom DHEAS. Miševi 3xTg-(+/+) su označeni zelenom bojom, 3xTg-AD crvenom, a miševi 3xTg-AD+DHEAS plavom.



Slika 41. Grafički prikaz rezultata analize OPLS-DA na podacima dobivenima metabolomskim profiliranjem uzoraka miške plazme metodom LC-MS u negativnom načinu ionizacije. **A)** Analiza OPLS-DA na podacima dobivenima metabolomskim profiliranjem uzoraka plazme kontrolnih 3xTg-(+/+) i miševa 3xTg-AD **B)** Analiza OPLS-DA na podacima dobivenima metabolomskim profiliranjem uzoraka plazme kontrolnih miševa 3xTg-(+/+) i miševa 3xTg-AD tretiranih lijekom DHEAS **C)** Analiza OPLS-DA na podacima dobivenima metabolomskim profiliranjem uzoraka plazme miševa 3xTg-AD i miševa 3xTg-AD tretiranih lijekom DHEAS. Miševi 3xTg-(+/+) su označeni zelenom bojom, 3xTg-AD crvenom, a miševi 3xTg-AD+DHEAS plavom.

Aminokiselina triptofan i njegov metabolit indolmliječna kiselina pokazali su nižu zastupljenost u skupini 3xTg-AD u odnosu na kontrolne miševe, dok je u skupini miševa tretiranih lijekom DHEAS došlo do povećanja razine ovih metabolita u odnosu na netretirane 3xTg-AD miševe (Tablica 5.). Svi detektirani metaboliti koji spadaju u skupinu masnih acila bili su značajno povišeni u skupini 3xTg-AD u usporedbi s kontrolnim miševima. Navedeni metaboliti uključuju oktadekansku (stearinsku),

dokozapentaenoinsku, palmitinsku i oleinsku masnu kiselinu, glicerolipid MG(18:4/0:0/0:0), ester masne kiseline ili hidroksi masnu kiselinu FAHFA(24:4-2-O-14:0) te konjugate masnih kiselina i karnitina, tetradekenilkarnitin i linoleilkarnitin (Tablica 5.). Analizom pomoću metode LC-MS detektiran je veliki broj različitih glicerofosfolipida te su njihove razine uglavnom bile povišene u skupinama miševa 3xTg-AD i 3xTg-AD+DHEAS, u usporedbi s kontrolnim miševima (Tablica 5.). Među identificiranim glicerofosfolipidima su različiti lipidi iz skupine PC te njihovi derivati LysoPC (Tablica 5.). Isti trend je vidljiv i u slučaju detektiranih i identificiranih lipida iz skupine PE, odnosno LysoPE (Tablica 5.). Rezultati multivarijatne i univarijatne statistike potvrdili su značajnu razliku u zastupljenosti navedenih glicerofosfolipida kod usporedbe skupina miševa 3xTg-AD s kontrolnim miševima (Tablica 5.). Unatoč tome što su se navedeni metaboliti proizašli kao značajni nakon multivarijatne i univarijatne statističke analize, treba napomenuti da je dio tih identificiranih metabolita izgubio značajnost nakon Benjamini-Hochbergove korekcije p vrijednosti dobivene univarijatnom statističkom obradom podataka. U slučaju usporedbe skupina miševa 3xTg-AD koji su razvili patologiju AB-a, a nisu tretirani lijekom DHEAS, i onih koji jesu tretirani ovim neurosteroidom, vidljivo je da je samo jedan glicerofosfolipid prošao rigoroznu univarijatnu te multivarijatnu statističku obradu na način da je u oba pristupa zadržao svoju značajnost. Radi se o lipidu PC(O-15:0/2:0) (Tablica 5.) Zastupljenost navedenog glicerofosfolipida bila je snižena kod miševa 3xTg-AD u odnosu na kontrolne životinje, a terapija neurosteroidom DHEAS je rezultirala povišenjem razine ovog glicerofosfolipida. Značajna razlika u zastupljenosti ovog glicerofosfolipida vidljiva je kod miševa tretiranih DHEAS-om u odnosu na miševe 3xTg-AD koji nisu tretirani, a pogotovo u odnosu na kontrolnu skupinu miševa (Tablica 5.). U slučaju preostalih detektiranih i identificiranih metabolita, univarijatna statistička analiza nije dala značajne rezultate. Isključivo je multivarijatnom statističkom obradom (Tablica 5.) proizašlo par metabolita čija je zastupljenost potencijalno pod utjecajem terapije lijekom DHEAS (triptofan, indolmliječna kiselina, oktadekanska kiselina, MG(18:4/0:0/0:0), FAHFA(24:4-2-O-14:0) te pojedini glicerofosfolipidi iz skupine LysoPE).

Tablica 5. Značajno promijenjeni metaboliti u uzorcima miše plazme detektirani metodom LC-MS, u pozitivnom i negativnom načinu ionizacije, između kontrolnih 3xTg(+/+) miševa te miševa 3xTg-AD koji nisu i onih koji jesu tretiranih lijekom DHEAS (3xTg-AD+DHEAS).

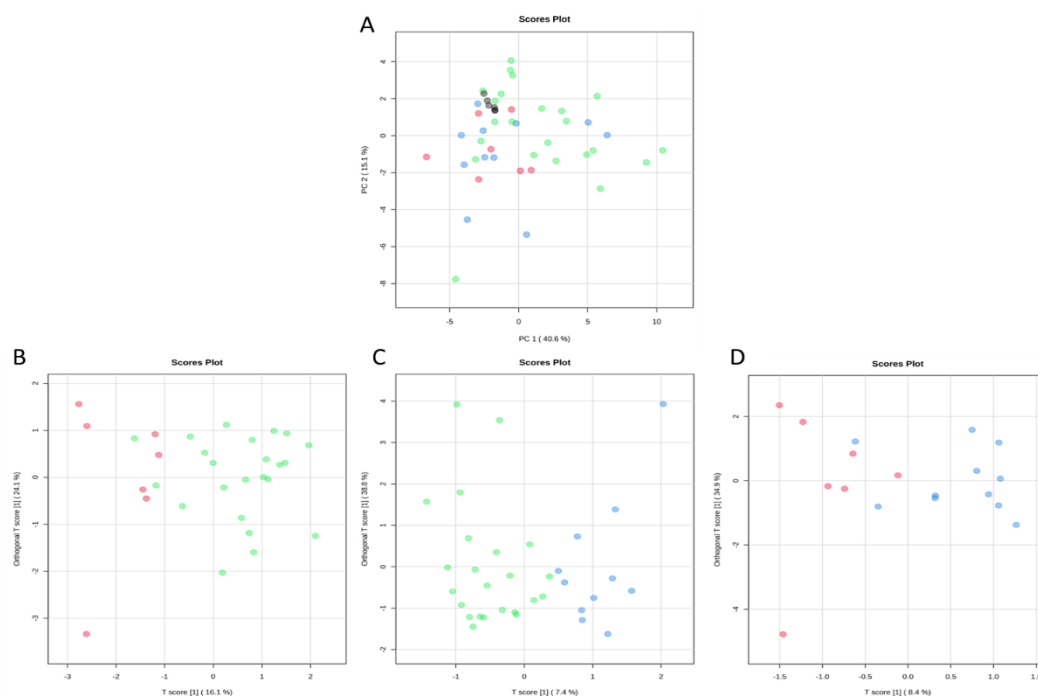
Kontrola vs. 3Tg-AD								Kontrola vs. 3Tg-AD +DHEAS				3Tg-AD vs. 3Tg-AD+DHEAS			
Metaboliti	m/z	RT	ESI	P*	p(BH)	%Δ	VIP	P*	p(BH)	%Δ	VIP	P*	p(BH)	%Δ	VIP
AMINOKISELINE, PEPTIDI I ANALOZI															
Phe-Ala-Arg	392,22	29,06	-	2.71E-02	4.64E-02	18,53	1,25	4.48E-02	NS	15,46	<1.00	NS	NS	-2,59	1,17
Triptofan	204,09	0,91	+	1.31E-02	2.60E-02	-21,52	1,59	NS	NS	-2,55	<1.00	NS	NS	24,17	1,42
MASNI ACILI															
Oktadekanska kiselina	282,26	29,53	-	1.71E-03	1.65E-02	49,67	1,27	4.86E-03	1.20E-02	38,75	<1.00	NS	NS	-7,29	1,25
Dokosapentaenska kiselina	330,26	26,80	-	7.74E-03	2.20E-02	43,77	1,18	3.13E-02	4.26E-02	26,69	<1.00	NS	NS	-11,88	<1.00
MG(18:4/0:0/0:0)	350,24	29,53	-	3.75E-03	1.65E-02	29,20	1,49	3.40E-02	1.52E-02	23,90	1,00	NS	NS	-4,10	1,18
FAHFA(24:4-2-O-14:0)	586,49	29,53	-	1.52E-03	1.65E-02	57,99	1,41	6.10E-03	1.20E-02	47,44	<1.00	NS	NS	-6,68	1,22
Palmitinska kiselina	256,24	29,05	+	3.57E-02	5.40E-02	17,51	1,15	NS	NS	17,45	<1.00	NS	NS	-0,05	<1.00
Oleinska kiselina	282,26	29,54	+	4.71E-03	1.80E-02	35,38	1,45	9.41E-03	1.62E-02	31,68	<1.00	NS	NS	-2,73	<1.00
Tetradekenilkaritin	369,29	12,48	+	4.38E-05	0.00E+00	118,67	1,88	8.37E-05	0.00E+00	119,81	1,43	NS	NS	0,52	<1.00
Linoleilkaritin	423,34	16,38	+	4.42E-04	0.00E+00	91,77	1,38	3.28E-03	6.75E-03	77,55	1,28	NS	NS	-7,42	<1.00
GLICEROFOSFOLIPIDI															
PC(O-16:1/2:0)	557,33	19,49	-	7.54E-03	4.13E-02	24,21	1,42	1.51E-02	7.33E-03	29,07	1,33	NS	NS	3,91	<1.00
PC(O-15:0/2:0)	509,35	20,69	+	3.97E-02	NS	-8,53	<1.00	1.08E-01	3.73E-02	20,76	<1.00	3.93E-02	NS	32,03	1,91
LysoPC(20:5)	587,32	15,08	-	NS	NS	38,54	1,20	3.75E-02	4.92E-02	30,72	1,09	NS	NS	-5,64	<1.00
LysoPC(15:0)	527,36	19,73	-	4.16E-02	3.77E-02	-17,28	1,50	NS	NS	-7,06	<1.00	NS	NS	12,36	<1.00
LysoPC(20:2)	593,27	16,67	-	2.90E-02	NS	18,94	1,03	NS	1.57E-02	21,52	<1.00	NS	NS	2,17	<1.00
LysoPC(18:1)	521,35	18,79	+	2.43E-03	2.60E-02	38,55	1,03	1.73E-03	0.00E+00	43,91	1,31	NS	NS	3,87	<1.00
LysoPC(20:4)	543,33	16,43	+	1.47E-05	2.57E-02	32,16	<1.00	3.21E-06	0.00E+00	51,89	1,59	NS	NS	14,93	<1.00
LysoPC(20:3)	543,33	17,01	+	8.64E-06	3.76E-02	22,33	<1.00	9.69E-07	0.00E+00	39,82	1,57	NS	NS	14,29	<1.00
LysoPC(18:0)	545,35	18,41	+	5.61E-04	1.20E-02	67,44	1,14	6.62E-04	0.00E+00	64,37	1,43	NS	NS	-1,84	<1.00
LysoPC(22:5)	569,35	18,90	+	4.31E-02	2.40E-02	42,88	1,05	NS	2.13E-02	26,04	<1.00	NS	NS	-11,79	<1.00
LysoPE(P-16:0)	437,29	19,30	-	5.57E-03	NS	7,74	<1.00	2.11E-03	1.10E-02	28,53	1,15	NS	NS	19,29	1,38
LysoPE(22:6)	525,29	16,67	-	2.23E-02	NS	23,26	1,06	3.99E-02	1.20E-02	27,47	<1.00	NS	NS	3,42	<1.00
LysoPE(20:4)	501,29	16,18	+	8.78E-03	NS	12,62	<1.00	6.16E-03	3.00E-03	37,79	1,08	NS	NS	22,35	1,14
LysoPE(22:0)	537,38	24,48	+	4.94E-02	NS	-1,34	<1.00	NS	1.60E-02	34,58	1,00	NS	NS	36,40	1,40
LysoPI(20:4)	620,30	18,34	-	1.07E-02	NS	29,44	1,16	3.86E-03	1.20E-02	48,65	1,28	NS	NS	14,84	1,02
INDOLI I DERIVATI															
Indolmliječna kiselina	187,06	0,91	+	2.22E-02	1.80E-02	-27,66	1,33	NS	NS	2,36	<1.00	4.43E-02	NS	41,49	1,47

DHEAS – dehidroepiandrosteron sulfat, ESI – način ionizacije elektrorasprišenjem: pozitivan (+) ili negativan (-), FAHFA - ester masne kiseline ili hidroksi masna kiselina, MG - monoacilglicerol, PC – fosfatidilkolin, PE – fosfatidiletanolamin, PI – fosfatidilinozitol, pBH - Benjamini–Hochbergova korekcija p vrijednosti dobivena t-testom ili Mann-Whitney U testom, p* - razina statističke značajnosti dobivena ANOVA ili Kruskal-Wallis testom, RT – vrijeme zadržavanja, VIP – varijabla važnosti u projekciji OPLS-DA modela, %Δ – postotak promjene (zeleno – pozitivan smjer promjene, crveno – negativan smjer promjene).

3.5.3. Metabolomsko profiliranje uzoraka plazme metodom GC-MS

Analizom mišje plazme metodom GC-MS detektirano je ukupno 55 metabolita, a nakon normalizacije prvobitnih podataka te statističke analize, ukupno 13 metabolita detektiranih metodom GC-MS bilo je značajno različito zastupljeno između kontrolnih, 3xTg-AD i 3xTg-AD miševa tretiranih lijekom DHEAS.

Grafički prikaz razdvajanja pojedinih životinja metodom PCA na temelju rezultata metabolomskog profiliranja uzoraka mišje plazme metodom GC-MS pokazao je slabije razdvajanje između ispitivanih skupina, ali dobro grupiranje uzoraka QC (Slika 42., A). Međutim, nakon generiranja modela OPLS-DA za podatke dobivene metodom GC-MS, uočeno je znatno bolje razdvajanje između ispitivanih skupina: kontrolnih miševa i miševa 3xTg-AD, kontrolnih miševa i miševa 3xTg-AD tretiranih lijekom DHEAS te miševa 3xTg-AD koji nisu i onih koji jesu tretirani lijekom DHEAS (Slika 42., B-D).



Slika 42. Grafički prikaz rezultata analize PCA i OPLS-DA na podacima dobivenima metabolomskim profiliranjem uzoraka mišje plazme metodom GC-MS. Metodom GC-MS analizirani su uzorci plazmi kontrolnih miševa 3xTg(+/-), 3xTg-AD miševa i 3xTg-AD miševa tretiranih lijekom DHEAS. **A)** Grafički prikaz analize PCA na podacima dobivenima neciljanom metabolomskom analizom plazme kontrolnih miševa, 3xTg-AD i miševa 3xTg-AD tretiranih lijekom DHEAS; **B)** Analiza OPLS-DA na podacima

dobivenima metabolomskim profiliranjem uzoraka plazme kontrolnih 3xTg-(+/+) i miševa 3xTg-AD **C)** Analiza OPLS-DA na podacima dobivenima metabolomskim profiliranjem uzoraka plazme kontrolnih miševa 3xTg-(+/+) i miševa 3xTg-AD tretiranih lijekom DHEAS **D)** Analiza OPLS-DA na podacima dobivenima metabolomskim profiliranjem uzoraka plazme miševa 3xTg-AD i miševa 3xTg-AD tretiranih lijekom DHEA. Miševi 3xTg-(+/+) su označeni **zelenom** bojom, 3xTg-AD **crvenom**, miševi 3xTg-AD+DHEAS **plavom**, a QC uzorci **sivom** bojom.

Metaboliti identificirani nakon analize GC-MS pripadali su skupinama aminokiselina, masnih acila, ugljikohidrata i steroida (Tablica 6.). Identificirano je nekoliko aminokiselina i njihovih derivata čije su razine bile snižene u skupini 3xTg-AD u odnosu na kontrolne miševe (multivarijatna statistička analiza), međutim među identificiranim metabolitima samo je aminokiselina glicin bila značajno snižena nakon multivarijatne i univarijatne statističke obrade podataka u skupini 3xTg-AD u odnosu na kontrolnu skupinu. U slučaju usporedbe kontrolnih miševa s miševima 3xTg-AD koji su tretirani DHEAS-om, uočena je značajno manja zastupljenost aminokiseline alotreonin kod skupine miševa 3xTg-AD (Tablica 6.). Ostale aminokiseline su ili bile značajne samo nakon multivarijatne statističke obrade ili nisu uopće bile značajne. Iz rezultata je vidljivo da model 3xTg-AD ima manju zastupljenost pojedinih aminokiselina u odnosu na kontrolnu skupinu (Tablica 6.). U slučaju usporedbe razine pojedinih aminokiselina između skupine miševa 3xTg-AD koji nisu tretirani u odnosu na one koji su primali lijek DHEAS nije bilo nikakvih statističkih značajnih razlika (Tablica 6.). Kolesterol, kao jedan od ključnih metabolita koji se vežu uz patologiju AB-a, bio je povišen u 3xTg-AD miševa u odnosu na kontrolne miševe, dok je u skupini 3xTg-AD nakon tretmana lijekom DHEAS došlo do smanjenja razine ovog metabolita, iako nije postignuta statistička značajnost nakon Benjamini-Hochbergove korekcije (Tablica 6.). Također, uočene su i promjene u razinama različitih masnih acila, kao što su 9-oktadekanska, linolna, oleinska i palmitinska kiselina, čije su razine bile povišene u miševa 3xTg-AD koji nisu i onih koji jesu tretirani DHEAS-om u usporedbi s kontrolnim miševima (Tablica 6.). U slučaju mliječne kiseline uočen je obrnuti trend (Tablica 6.). Usporedba rezultata dobivenih nakon analize uzoraka plazme metodom LC-MS i GC-MS definitivno sugerira važnu povezanost metabolizma masnih kiselina te pojedinih aminokiselina s patologijom AB-a koja je prisutna kod mišjeg modela 3xTg-AD.

Tablica 6. Značajno promijenjeni metaboliti u uzorcima mišje plazme detektirani metodom GC-MS, između kontrolnih 3xTg(+/-) miševa te miševa 3xTg-AD koji nisu i onih koji jesu tretiranih lijekom DHEAS (3xTg-AD+DHEAS).

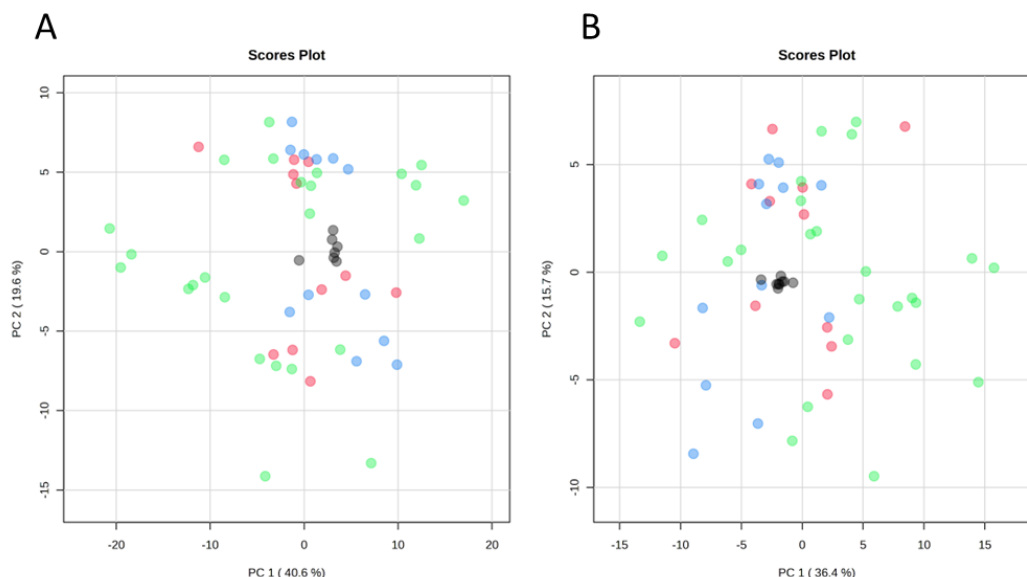
Kontrola vs. 3Tg-AD						Kontrola vs. 3Tg-AD +DHEAS				3Tg-AD vs. 3Tg-AD+DHEAS			
Metaboliti	RT	P*	p(BH)	%Δ	VIP	P*	p(BH)	%Δ	VIP	P*	p(BH)	%Δ	VIP
AMINOKISELINE, PEPTIDI I ANALOZI													
Aminomalonska kiselina	12,50	NS	NS	-40,4	<1.00	NS	NS	-38,9	1,67	NS	NS	2,5	<1.00
Glicin	10,37	1.98E-02	NS	-68,3	1,14	NS	NS	-45,8	<1.00	NS	NS	70,8	<1.00
Alotreonin	10,20	NS	NS	-57,6	1,07	3.13E-02	NS	-55,0	1,47	NS	NS	6,2	1,57
Glutaminska kiselina	13,17	NS	NS	-37,7	1,05	NS	NS	-36,4	1,00	NS	NS	2,2	<1.00
Propionska kiselina	6,71	NS	NS	-45,4	1,36	NS	NS	-17,4	<1.00	NS	NS	51,2	1,13
MASNI ACILI													
9-oktadekanska kiselina	20,44	4.81E-03	NS	55,7	1,29	1.05E-02	NS	46,8	1,73	NS	NS	-5,8	<1.00
Linolna kiselina	20,38	8.71E-03	NS	55,7	1,47	1.05E-02	NS	46,6	1,61	NS	NS	-5,9	<1.00
Oleinska kiselina	20,44	4.81E-03	NS	55,7	1,28	1.94E-02	NS	44,8	1,64	NS	NS	-7,0	<1.00
Palmitinska kiselina	18,85	1.16E-02	NS	28,8	<1.00	NS	NS	21,9	1,29	NS	NS	-5,3	<1.00
3-hidroksibutirična kiselina	8,30	NS	NS	57,2	1,40	NS	NS	-2,1	<1.00	NS	NS	-37,8	1,01
Mliječna kiselina	6,86	1.00E-02	NS	-44,1	1,27	NS	NS	-24,6	<1.00	NS	NS	34,9	<1.00
UGLJIKOHIDRATI													
Glicerol	9,89	NS	NS	4,1	<1.00	1.85E-02	NS	34,7	1,70	NS	NS	29,4	<1.00
STEROIDI													
Kolesterol	27,55	2.99E-04	0.00E+00	69,7	2,30	2.79E-03	3.40E-02	48,7	2,20	NS	NS	-12,4	1,05

DHEAS – dehidroepiandrosteron sulfat, RT – vrijeme zadržavanja, pBH - Benjamini–Hochbergova korekcija p vrijednosti dobivena t-testom ili Mann-Whitney U testom, p* - razina statističke značajnosti dobivena ANOVA ili Kruskal-Wallis testom, VIP – varijabla važnosti u projekciji OPLS-DA modela, %Δ – postotak promjene (zeleno – pozitivan smjer promjene, crveno – negativan smjer promjene).

3.5.4. Metabolomsko profiliranje uzoraka tkiva metodom LC-MS

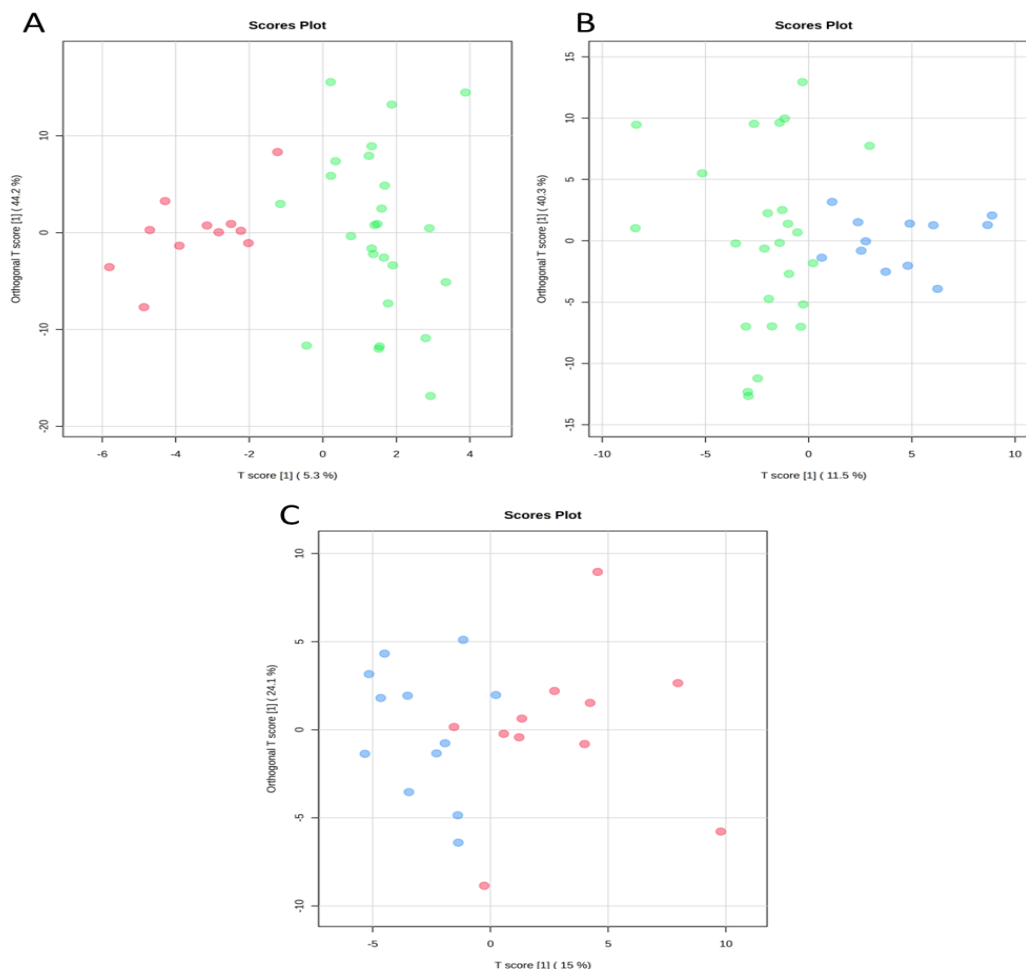
Uz pomoć metode LC-MS/MS u uzorcima mišjeg tkiva mozga detektirano je 176 metabolita u pozitivnom, odnosno 138 metabolita u negativnom načinu ionizacije. Nakon normalizacije podataka i statističke obrade, identificirano je ukupno 30 metabolita koji su bili značajno različito zastupljeni u ispitivanim skupinama miševa, od toga 14 u pozitivnom, a 13 u negativnom načinu ionizacije. Detektirani metaboliti pripadali su skupinama karboksilnih i hidroksi kiselina, aminokiselina, glicerofosfolipida, masnih acila, purinskih derivati te organooksigenih spojeva (Tablica 7.).

Za oba načina ionizacije generiran je grafički prikaz razdvajanja pojedinih životinja metodom PCA koji pokazuje slabije razdvajanje između ispitivanih skupina, dok uzorci QC pokazuju dobru grupaciju, osobito u negativnom načinu ionizacije (Slika 43., A i B). Međutim, nakon generiranja modela OPLS-DA za podatke dobivene pozitivnim i negativnim načinom ionizacije, uočeno je znatno bolje razdvajanje između ispitivanih skupina: kontrolnih miševa i miševa 3xTg-AD, kontrolnih miševa i miševa 3xTg-AD tretiranih lijekom DHEAS te miševa 3xTg-AD koji nisu i onih koji jesu tretirani lijekom DHEAS (Slika 44. i 45.).

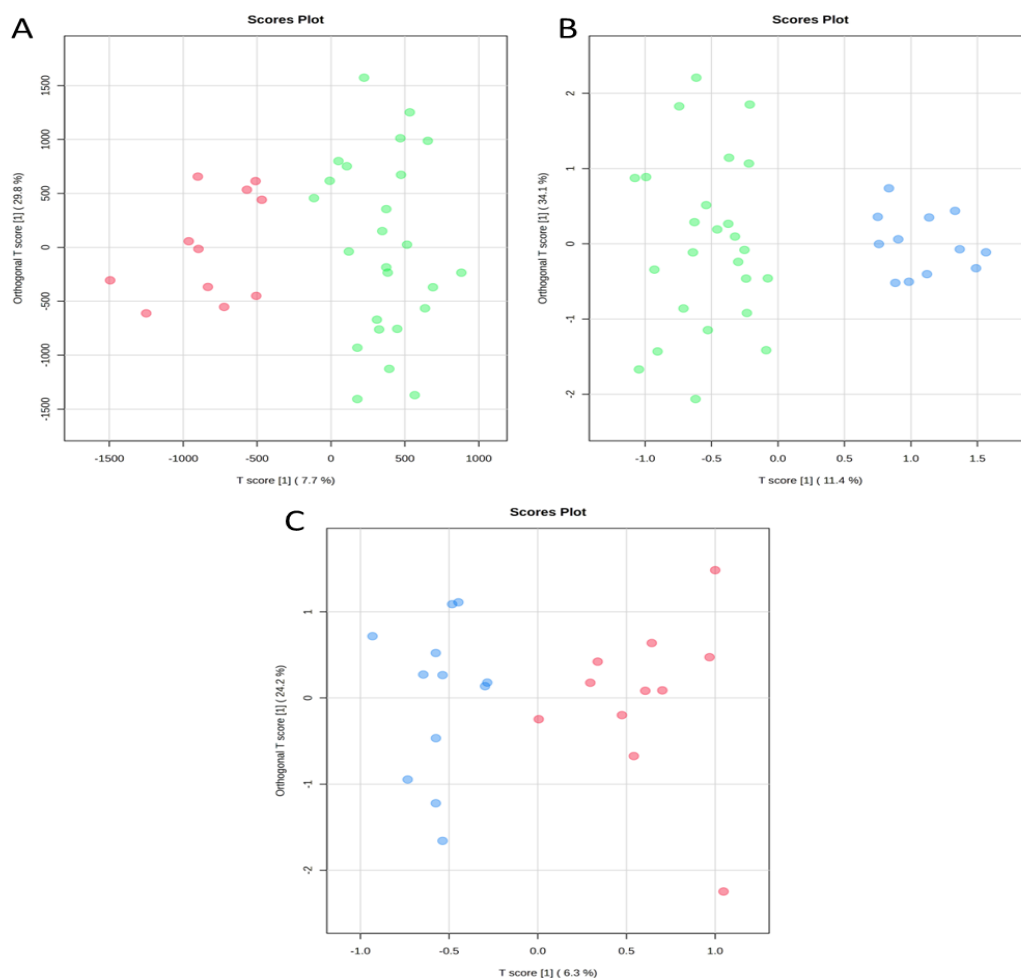


Slika 43. Grafički prikaz rezultata analize PCA na podacima dobivenima metabolomskim profiliranjem uzoraka tkiva mišjeg mozga metodom LC-MS. Metodom LC-MS analizirani su uzorci tkiva mozga kontrolnih miševa 3xTg(+/+), 3xTg-AD miševa i 3xTg-AD miševa tretiranih lijekom DHEAS. **A)** Neciljano metabolomsko profiliranje metodom LC-MS u

pozitivnom načinu ionizacije; **B)** Neciljano metabolomsko profiliranje metodom LC-MS u negativnom načinu ionizacije. Miševi 3xTg-(+/+) su označeni **zelenom** bojom, 3xTg-AD **crvenom**, miševi 3xTg-AD+DHEAS **plavom**, a QC uzorci **sivom** bojom.



Slika 44. Grafički prikaz rezultata analize OPLS-DA na podacima dobivenima metabolomskim profiliranjem uzoraka tkiva mišjeg mozga metodom LC-MS u pozitivnom načinu ionizacije. **A)** Analiza OPLS-DA na podacima dobivenima metabolomskim profiliranjem uzoraka tkiva mozga kontrolnih 3xTg-(+/+) i miševa 3xTg-AD **B)** Analiza OPLS-DA na podacima dobivenima metabolomskim profiliranjem uzoraka tkiva mozga kontrolnih miševa 3xTg-(+/+) i miševa 3xTg-AD tretiranih lijekom DHEAS **C)** Analiza OPLS-DA na podacima dobivenima metabolomskim profiliranjem uzoraka tkiva mozga miševa 3xTg-AD i miševa 3xTg-AD tretiranih lijekom DHEA. Miševi 3xTg-(+/+) su označeni **zelenom** bojom, 3xTg-AD **crvenom**, a miševi 3xTg-AD+DHEAS **plavom**.



Slika 45. Grafički prikaz rezultata analize OPLS-DA na podacima dobivenima metabolomskim profiliranjem uzoraka tkiva mišjeg mozga metodom LC-MS u negativnom načinu ionizacije. **A)** Analiza OPLS-DA na podacima dobivenima metabolomskim profiliranjem uzoraka tkiva mozga kontrolnih 3xTg-(+/+) i miševa 3xTg-AD **B)** Analiza OPLS-DA na podacima dobivenima metabolomskim profiliranjem uzoraka tkiva mozga kontrolnih miševa 3xTg-(+/+) i miševa 3xTg-AD tretiranih lijekom DHEAS **C)** Analiza OPLS-DA na podacima dobivenima metabolomskim profiliranjem uzoraka tkiva mozga miševa 3xTg-AD i miševa 3xTg-AD tretiranih lijekom DHEA. Miševi 3xTg-(+/+) su označeni zelenom bojom, 3xTg-AD crvenom, a miševi 3xTg-AD+DHEAS plavom.

Metodom LC-MS/MS identificirano je više različitih glicerofosfolipida čija zastupljenost je bila značajno različita kod uspoređivanih skupina (Tablica 7.). Međutim, iz rezultata je vidljivo da su statistički značajne razlike u zastupljenosti pojedinih glicerofosfolipida prvenstveno prisutne kod usporedbe miševa 3xTg-AD koji su tretirani neurosteroidom DHEAS u odnosu na kontrolnu skupinu. U pravilu radi se o povišenoj razini različitih

glicerofosfolipida koji spadaju u skupinu LysoPC (Tablica 7.). U skupini 3xTg-AD+DHEAS uočena je viša razina nekoliko lizofosfatidilkolina, uključujući LysoPC(16:0), LysoPC(18:2), LysoPC(20:4), LysoPC(O-18:1). Iz usporedbe je vidljivo da je dio tih glicerofosfolipida značajno zastupljeniji u tkivu mozga miševa tretiranih DHEAS-om i u odnosu na miševa 3xTg-AD koji nisu primali terapiju (Tablica 7.), pri čemu su statističku značajnost postigla tri metabolita, i to lysoPC(18:3), lysoPC(O-20:4) i lysoPC(O-18:1). Navedeno upućuje na povezanost DHEAS-a s metabolizmom pojedinih lysoPC lipida. Niti jedan identificirani glicerofosfolipid nije prošao strogi probir kombinacijom univarijatne i multivarijatne statističke obrade kada govorimo o usporedbi modela 3xTg-AD i kontrolne skupine miševa. Jabučna kiselina bila je povišena u obje skupine 3xTg-AD miševa u usporedbi s kontrolnim miševima, no nije uočena značajna razlika između skupine 3xTg-AD koja je tretirana lijekom DHEAS i kontrolne skupine 3xTg-AD (Tablica 7.). Purinski metaboliti, hipoksantin i ksantozin, također su bili zastupljeniji u obje skupine miševa 3xTg-AD u odnosu na kontrolu, međutim između tretirane i netretirane skupine 3xTg-AD nije zabilježena značajna razlika u razini ovih metabolita (Tablica 7.). Za različite aminokiseline i njihove analoge pronađena je tendencija koja bi upućivala na razlike u metabolizmu aminokiselina između ispitivanih skupina životinja. U slučaju usporedbe modela 3xTg-AD s kontrolnim životinjama, vidljiva je razlika u razini 5-aminovaleranske kiseline te citrulina (Tablica 7.) Te razlike nisu zadržane nakon FDR korekcije. Značajne razlike uočene su u skupini 3xTg-AD+DHEAS, u usporedbi s kontrolom, pri čemu su se istaknule razlike u razinama leucina i fenilalanina (Tablica 7.), što može upućivati na učinak DHEAS-a na metabolizam aminokiselina. Uz navedene metabolite, značajnoj razlici između ove dvije skupine životinja pridonosi i viša razina argininosukcinatne kiseline kod skupine 3xTg-AD+DHEAS te isti obrazac promjene u razini 5-aminovaleranske kiseline te citrulina koji vidimo i kod skupine 3xTg-AD u odnosu na kontrolu (Tablica 7.). Sličan obrazac promjena koji vidimo u slučaju aminokiselina i njihovih derivata, uočen je i kod limunske kiseline i pirolglutamata, čije su razine bile povišene u skupini 3xTg-AD+DHEAS u usporedbi s kontrolnom skupinom (Tablica 7.), dok nije bilo statistički značajna razlika u razini ovih metabolita između miševa 3xTg-AD i kontrolne skupine, kao ni u slučaju usporedbe skupine 3xTg-AD koja je netretirana i one koja je tretirana DHEAS-om. Međutim, treba napomenuti da prema rezultatima multivarijantne statističke analize, ovi metaboliti značajno doprinose razdvajanju ovih skupina u modelu OPLS-DA i imaju vrijednost VIP veću od 1 (Tablica 7.). Značajna razlika u razinama N-acetilneuraminske kiseline i Vitamina B5 uočene su između skupina 3xTg-AD i 3xTg-AD+DHEAS, u usporedbi s kontrolnim miševima, dok ove razlike nisu bile značajne niti u nakon multivarijatne, niti nakon univarijatne statističke analize kada govorimo o usporedbi između dviju skupina 3xTg-AD (Tablica 7.).

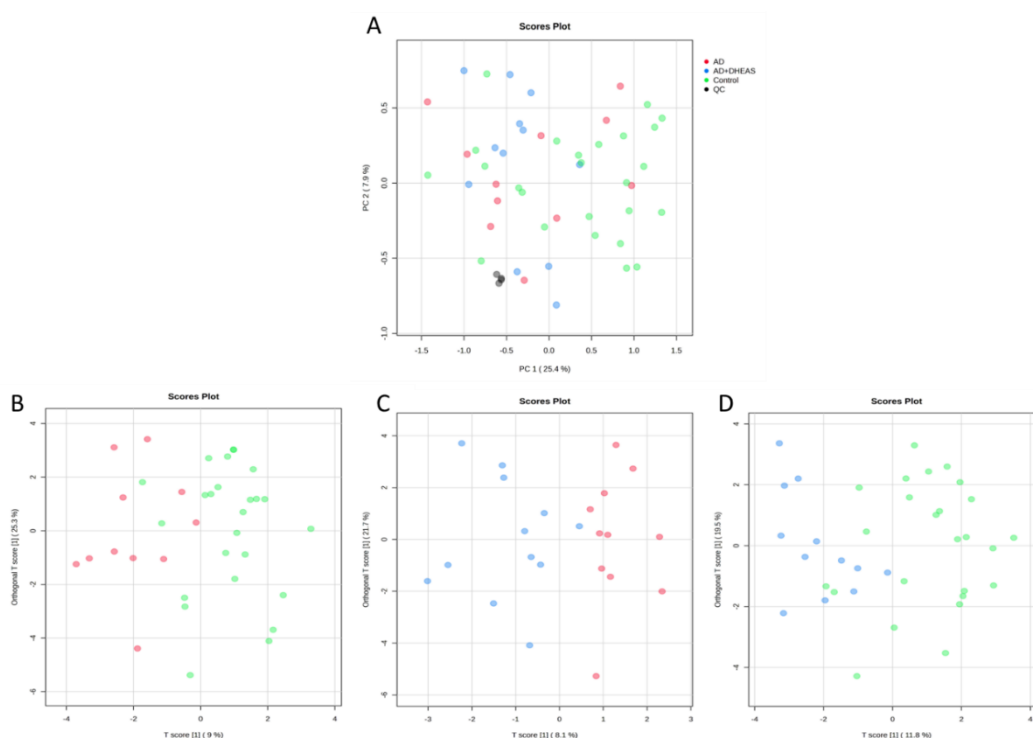
Tablica 7. Značajno promijenjeni metaboliti tkiva mišjeg mozga detektirani metodom LC-MS, u pozitivnom i negativnom načinu ionizacije, između kontrolnih 3xTg(+/-) miševa te miševa 3xTg-AD koji nisu i onih koji jesu tretiranih lijekom DHEAS (3xTg-AD+DHEAS).

Kontrola vs. 3Tg-AD								Kontrola vs. 3Tg-AD +DHEAS				3Tg-AD vs. 3Tg-AD+DHEAS			
Metaboliti	m/z	RT	ESI	P*	p(BH)	%Δ	VIP	P*	p(BH)	%Δ	VIP	P*	p(BH)	%Δ	VIP
KARBOKSILNE KISELINE															
Limunska kiselina	191.02	1.10	-	NS	NS	35.81	1.59	2,83E-03	2,50E-03	63.50	2.12	NS	NS	20.39	1.66
Sukcinska kiselina	119.04	1.00	+	NS	NS	16.16	1.02	NS	NS	22.70	<1.00	NS	NS	5.63	<1.00
AMINOKISELINE, PEPTIDI I ANALOZI															
Fenilalanin	164.07	3.50	-	NS	NS	16.58	<1.00	NS	1,95E-02	34.19	1.11	NS	NS	15.10	1.20
Argininosukcinska kiselina	291.13	0.60	+	NS	NS	27.93	1.78	5,60E-03	2,68E-02	39.77	<1.00	NS	NS	9.25	<1.00
Asparaginska kiselina	134.05	0.90	+	NS	NS	-26.13	1.71	NS	NS	-11.51	<1.00	NS	NS	19.79	<1.00
5-aminovaleranska kiselina	160.13	0.60	+	1,09E-03	4,47E-02	-34,18	2,26	3,63E-02	2,87E-02	-38,48	2,11	NS	NS	-6,52	<1.00
Leucin	132.10	1.10	+	NS	NS	2.07	<1.00	1,04E-02	3,69E-02	45.74	1.51	NS	NS	42.78	<1.00
Citrulin	214.06	0,50	+	1,04E-03	NS	29,37	3,00	1,50E-02	4,02E-02	46,92	<1.00	NS	NS	13,57	<1.00
N-acetilaspargat	198.04	0.90	+	NS	NS	-29.86	1.71	NS	NS	-17.82	<1.00	NS	NS	17.17	<1.00
Piroglutamat	279.06	1.00	-	NS	NS	19.28	1.60	1,25E-02	1,30E-02	23.51	1.71	NS	NS	3.55	<1.00
MASNI ACILI															
Prostaglandin E1	353.23	7.20	-	NS	NS	21.52	1.32	NS	3,69E-02	22.41	1.06	NS	NS	0.73	<1.00
GLICEROFOSFOLIPIDI															
LysoPC(18:0)	524.37	10.70	+	NS	NS	-1.23	<1.00	NS	NS	19.10	<1.00	NS	NS	20.59	1.93
LysoPC(18:1)	544.34	9.80	+	NS	NS	10.32	<1.00	1,02E-02	3,35E-02	31.27	<1.00	NS	NS	18.99	1.23
LysoPC(18:3)	518.32	9.40	+	NS	NS	3.99	<1.00	2,12E-02	NS	22.93	<1.00	1,38E-02	NS	18.21	1.92
LysoPC(16:0)	540.33	9.60	-	NS	NS	9.99	<1.00	4,08E-02	4,45E-02	25.53	1.17	NS	NS	14.13	1.56
LysoPC(18:2)	564.33	9.20	-	NS	NS	36.71	1.28	4,52E-03	1,37E-02	46.16	1.68	NS	NS	6.91	<1.00
LysoPC(20:4)	588.33	9.20	-	NS	NS	9.19	<1.00	NS	2,13E-02	31.97	1.45	NS	NS	20.86	1.24
LysoPC(O-18:1)	522.36	9.70	+	NS	NS	5.34	<1.00	2,28E-02	4,02E-02	27.43	1.91	4,18E-02	NS	20.97	1.22
LysoPC(O-20:4)	544.34	9.10	+	NS	NS	2.28	<1.00	3,29E-02	NS	25.11	<1.00	2,00E-02	NS	22.32	1.46
LysoPC(O-22:4)	572.37	9.80	+	NS	NS	7.26	<1.00	NS	NS	19.22	<1.00	NS	NS	11.15	1.40
LysoPC(22:6)	612.33	9.20	-	NS	NS	1.75	<1.00	NS	4,45E-02	23.19	1.24	NS	NS	21.08	2.02
LysoPE(18:1)	478.29	9.70	-	NS	NS	10.56	<1.00	NS	4,45E-02	27.09	1.07	NS	NS	14.95	1.54
HIDROKSI KISELINE															
Jabučna kiselina	133.01	0.80	-	1,86E-02	NS	43.55	1.78	3,29E-04	7,70E-04	63.35	1.86	NS	NS	13.79	<1.00
PURINI I PURINSKI DERIVATI															
Hipoksantin	271.07	4.50	-	1,44E-02	NS	19.36	1.73	4,55E-04	1,91E-03	26.49	1.73	NS	NS	5.98	1.14
Ksantozin	283.07	3.90	-	NS	NS	23.69	1.36	3,93E-02	2,13E-02	30.84	1.19	NS	NS	5.78	1.08
ORGANOOKSIGENI SPOJEVI															
N-acetilneuraminska kiselina	310.11	0.60	+	2,48E-02	NS	22.87	2.06	1,64E-03	2,98E-02	25.01	<1.00	NS	NS	1.74	<1.00
Vitamin B5	437.21	4.10	-	2,79E-02	NS	38.51	1.34	7,08E-03	1,59E-02	49.00	<1.00	NS	NS	7.57	<1.00

DHEAS – dehidroepiandrosteron sulfat, ESI – način ionizacije elektroraspršenjem: pozitivan (+) ili negativan (-), pBH - Benjamini–Hochbergova korekcija p vrijednosti dobivena t-testom ili Mann-Whitney U testom, PC – fosfatidilkolin, PE – fosfatidiletanolamin, p* - razina statističke značajnosti dobivena ANOVA ili Kruskal-Wallis testom, RT – vrijeme zadržavanja, VIP – varijabla važnosti u projekciji OPLS-DA modela, %Δ – postotak promjene (zeleno – pozitivan smjer promjene, crveno – negativan smjer promjene).

3.5.5. Metabolomsko profiliranje uzoraka tkiva metodom GC-MS

Metodom GC-MS u uzorcima tkiva mišjeg mozga detektirano je ukupno 59 metabolita, a nakon provedene statističke analize njih 13 je bilo značajno različito zastupljeno između uspoređivanih skupina životinja. Detektirani i identificirani metaboliti pripadali su skupinama aminokiselina, masnih acila, organooksigenih spojeva i steroida (Tablica 8.). Grafički prikaz razdvajanja pojedinih životinja metodom PCA na temelju rezultata metabolomskog profiliranja uzoraka tkiva mišjeg mozga metodom GC-MS pokazao je slabije razdvajanje između ispitivanih skupina, ali dobro grupiranje uzoraka QC (Slika 46., A). Međutim, nakon generiranja modela OPLS-DA za podatke dobivene metodom GC-MS, uočeno jasniju vizualizaciju varijabli koje najviše doprinose razlikama među skupinama te bolje razdvajanje između eksperimentalnih skupina: kontrolnih miševa i miševa 3xTg-AD, kontrolnih miševa i miševa 3xTg-AD tretiranih lijekom DHEAS te miševa 3xTg-AD koji nisu i onih koji jesu tretirani lijekom DHEAS (Slika 46., B-D).



Slika 46. Grafički prikaz rezultata analize PCA i OPLS-DA na podacima dobivenima metabolomskim profiliranjem uzoraka mišje plazme metodom GC-MS. Metodom GC-MS analizirani su uzorci plazmi kontrolnih miševa 3xTg(+/-), 3xTg-AD miševa i 3xTg-AD miševa tretiranih lijekom DHEAS. **A)** Grafički prikaz analize PCA na podacima dobivenima neciljanom metabolomskom analizom plazme kontrolnih miševa, 3xTg-AD

i miševa 3xTg-AD tretiranih lijekom DHEAS; **B)** Analiza OPLS-DA na podacima dobivenima metabolomskim profiliranjem uzoraka plazme kontrolnih 3xTg-(+/+) i miševa 3xTg-AD **C)** Analiza OPLS-DA na podacima dobivenima metabolomskim profiliranjem uzoraka plazme kontrolnih miševa 3xTg-(+/+) i miševa 3xTg-AD tretiranih lijekom DHEAS **D)** Analiza OPLS-DA na podacima dobivenima metabolomskim profiliranjem uzoraka plazme miševa 3xTg-AD i miševa 3xTg-AD tretiranih lijekom DHEA. Miševi 3xTg-(+/+) su označeni **zelenom** bojom, 3xTg-AD **crvenom**, a miševi 3xTg-AD+DHEAS **plavom**.

Metodom GC-MS na uzorcima tkiva mišjeg mozga u pravilu su detektirani metaboliti koji pripadaju skupini aminokiselina i njihovih derivata (aminomalonska, asparaginska i pirolutaminska kiselina, glicin, piroglutamat, leucin, treonin, valin). Među njima identificiran je i glavni inhibicijski neurotransmitter, GABA, čije su razine bile su povišene u skupini 3xTg-AD+DHEAS u usporedbi s kontrolnom i netretiranom skupinom miševa 3xTg-AD (Tablica 8.). Međutim, nije uočena statistički značajna razlika u razini ovog metabolita između skupine 3xTg-AD i kontrolne skupine, što upućuje na mogući učinak DHEAS-a na GABA-ergični sustav. U slučaju piroglutamata, leucina i treonina, pronađene su više razine u skupini 3xTg-AD+DHEAS u odnosu na kontrolnu skupinu, međutim nije utvrđena značajna razlika između ostalih uspoređivanih skupina (Tablica 8.). Među detektiranim masnim acilima, stearinska kiselina bila je povišena u skupinama 3xTg-AD i 3xTg-AD+DHEAS u odnosu na kontrolnu skupinu, dok je u skupini tretiranoj s DHEAS-om uočen trend smanjenja razine ovog metabolita u usporedbi s netretiranom skupinom, ali taj trend nije postigao statističku značajnost (Tablica 8.). Glicerinska kiselina je pokazivala sličan obrazac promjena, s povišenim razinama u skupinama koje modeliraju AB u odnosu na kontrolu te s trendom sniženja nakon tretmana neurosteroidom DHEAS. Iako je kolesterol značajno doprinio razdvajanju skupina u modelu OPLS-DA te mu je dodijeljena vrijednost $VIP > 1$ ($VIP = 1,55$), univarijatnom statističkom obradom nije potvrđena njegova značajnost te doprinos razdvajanju između skupina 3xTg-AD i kontrolnih miševa (Tablica 8.).

Tablica 8. Značajno promijenjeni metaboliti tkiva mišjeg mozga detektirani metodom GC-MS između kontrolnih 3xTg(+/+) miševa te miševa 3xTg-AD koji nisu i onih koji jesu tretiranih lijekom DHEAS (3xTg-AD+DHEAS).

			Kontrola vs. 3Tg-AD				Kontrola vs. 3Tg-AD +DHEAS				3Tg-AD vs. 3Tg-AD+DHEAS			
Metaboliti	RT	P*	p(BH)	%Δ	VIP	P*	p(BH)	%Δ	VIP	P*	p(BH)	%Δ	VIP	
AMINOKISELINE, PEPTIDI I ANALOZI														
γ-aminobutirna kiselina (GABA)	13.39	NS	NS	23.60	1.19	2,84E-03	3,80E-02	52.86	1.62	3,64E-02	NS	23.67	1.36	
Aminomalonska kiselina	12.63	NS	NS	26.56	1.53	NS	NS	35.75	1.13	NS	NS	7.26	<1.00	
Asparaginska kiselina	13.25	NS	NS	33.55	1.29	NS	NS	19.25	<1.00	NS	NS	-10.70	1.32	
Glicin	10.48	NS	NS	40.20	1.08	NS	NS	39.62	1.24	NS	NS	-0.42	<1.00	
Piroglutamat	13.30	NS	NS	22.12	1.21	4,70E-02	NS	32.02	1.57	NS	NS	8.11	<1.00	
Leucin	8.35	NS	NS	16.96	<1.00	1,64E-02	NS	62.41	1.26	NS	NS	38.86	<1.00	
Treonin	10.30	NS	NS	-11.13	<1.00	2,31E-02	NS	5.26	<1.00	NS	NS	18.44	1.40	
Valin	14.04	NS	NS	-17.12	<1.00	NS	NS	7.96	<1.00	NS	NS	30.27	1.90	
MASNI ACILI														
Oleinska kiselina	20.61	1,16E-02	NS	29.07	1.99	NS	NS	17.38	1.36	NS	NS	-9.05	1.59	
Stearinska kiselina	20.84	6,00E-03	3,80E-02	35.63	2.35	4,70E-02	NS	25.89	1.55	NS	NS	-7.18	1.01	
ORGANOOKSIGENI SPOJEVI														
Glicerinska kiselina	10.77	1,05E-02	NS	54.58	1.57	2,74E-02	NS	45.91	1.52	NS	NS	-5.61	<1.00	
STEROIDI														
Kolesterol	27.74	NS	NS	32.23	1.55	NS	NS	22.48	<1.00	NS	NS	-7.37	<1.00	

DHEAS – dehidroepiandrosteron sulfat, RT – vrijeme zadržavanja, pBH - Benjamini–Hochbergova korekcija p vrijednosti dobivena t-testom ili Mann-Whitney U testom, p* - razina statističke značajnosti dobivena ANOVA ili Kruskal-Wallis testom, VIP – varijabla važnosti u projekciji OPLS-DA modela, %Δ – postotak promjene (zeleno – pozitivan smjer promjene, crveno – negativan smjer promjene).

5. RASPRAVA

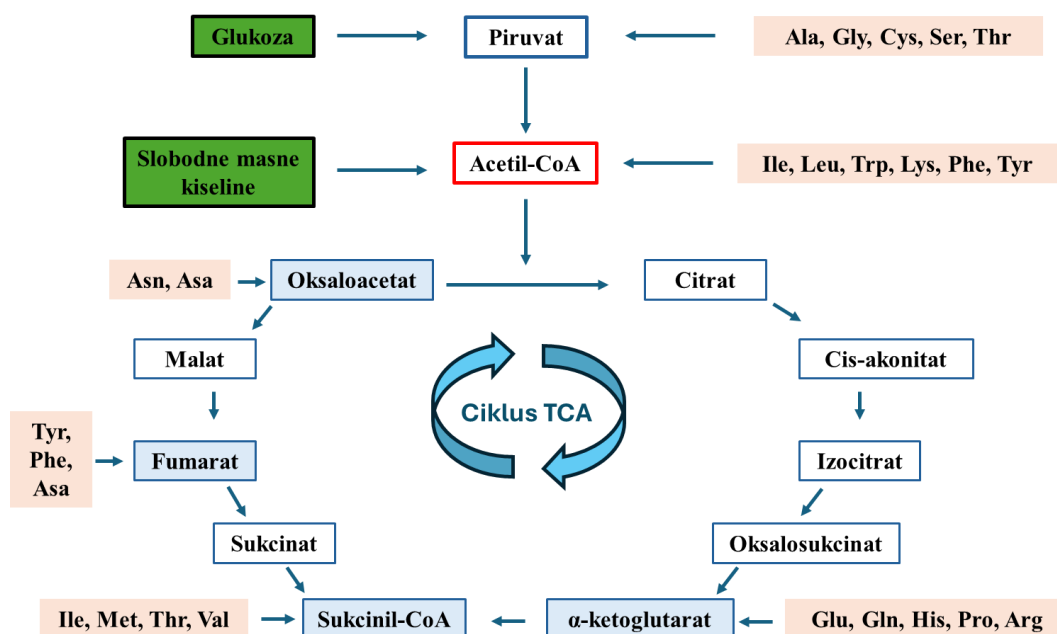
Glavni cilj ovog istraživanja bio je ispitati promjene u plazmatskom metabolomskom profilu osoba oboljelih od AB-a u usporedbi sa zdravim kontrolnim ispitanicima te ispitanicima s dijagnozom MCI-ja. Dodatna vrijednost ovog istraživanja očituje se u provedbi metabolomske analize na plazmi i tkivu prefrontalnog korteksa mišjeg modela AB-a, 3xTg-AD, čime je omogućena usporedba metaboličkih profila između ljudi i životinja. Takav pristup osobito je važan s obzirom na činjenicu da se pretklinička ispitivanja potencijalnih lijekova za liječenje AB-a najčešće provode upravo na animalnim modelima bolesti. Nadalje, 3xTg-AD miševi su u ovom istraživanju bili tretirani neurosteroidom DHEAS, koji ima važnu ulogu u normalnom funkcioniranju mozga, kako bi se ispitao njegov učinak na metaboličke puteve koji su uključeni u patologiju AB-a. Neciljane metabolomske analize na platformama LC-MS i GC-MS provedene su s ciljem identifikacije promijenjenih metabolita te određivanja metabolomskog profila plazme oboljelih od AB-a, ispitanika s MCI-jem i kontrolnih ispitanika, kao i metabolomskog profila plazme i moždanog tkiva mišjeg modela bolesti, uključujući životinje tretirane neurosteroidom DHEAS i netretirane životinje 3xTg-AD. Rezultati ovog istraživanja mogu doprinijeti boljem razumijevanju patofizioloških mehanizama AB-a, kao i identifikaciji potencijalnih biomarkera s poboljšanom dijagnostičkom i prognostičkom vrijednošću.

Dosadašnja istraživanja, uključujući i ovo, pokazala su postojanje značajnih promjena u metaboličkim profilima između oboljelih od AB-a, ispitanika s MCI-jem te zdravim kontrolnih ispitanika. Ove promjene prvenstveno su povezane s poremećenom energetsom homeostazom u plazmi, promjenama u metabolitima uključenima u ciklus limunske kiseline (TCA), narušenom neurotransmisijom i aktivacijom upalnih procesa. Ipak najizraženije promjene uočene su u metabolizmu lipida i energetsom metabolizmu. Slični obrasci metaboličkih promjena zabilježeni su i na mišjem modelu AB-a, pri čemu su poremećaji metaboličkih puteva bili najizraženiji u metabolizmu lipida i aminokiselina. Promjene identificirane u plazmi i moždanom tkivu miševa pokazale su u nekoj mjeri podudarnosti s plazmatskim metabolomskim profilom kod ljudi.

S obzirom na to da dosadašnja istraživanja još uvijek nisu rezultirala razvojem učinkovitih terapijskih intervencija za liječenje AB-a, istraživački fokus sve više je preusmjeren prema identifikaciji novih terapijskih meta i ranih mehanizama u podlozi nastanka AB-a. Budući da metabolomika omogućuje istodobno praćenje promjena u više međusobno povezanih metaboličkih puteva, što je ključno za razumijevanje složenih metaboličkih poremećaja, njezina primjena u istraživanju AB-a sve više dobiva na značaju.

5.1. Promjene u metabolizmu aminokiselina i energije u AB-u

Aminokiseline su važni strukturni elementi većih peptida i proteina te međuprodukti koji imaju ključnu ulogu u različitim metaboličkim procesima. Osim što predstavljaju esencijalne supstrate za sintezu proteina, aminokiseline su prekursori različitih metabolita i lipida te imaju važnu ulogu u regulaciji ekspresije gena i staničnoj signalizaciji (308–310). Dodatno, aminokiseline služe kao izvor metaboličkih intermedijera koji ulaze u ciklus TCA i služe za proizvodnju energije (Slika 47.) (311). Neciljanom metabolomskom analizom identificirani su brojni metaboliti koji pripadaju skupinama aminokiselina i njihovih derivata te ključni intermedijeri ciklusa TCA, koji su usko povezani s energetske metabolizmom.



Slika 47. Aminokiseline kao izvor intermedijera za normalno funkcioniranje TCA ciklusa.

Acetil-CoA – acetil koenzim A, Ala – alanin, Arg – arginin, Asa – asparaginska kiselina, Asn – asparagin, Cys – cistein, Gln – glutamin, Glu –glutaminska kiselina, Gly – glicin, His – histidin, ile – izoleucin, Leu - leucin, Lys – lizin, Met – metionin, Phe – fenilalanin, Pro – prolin, Ser – serin, TCA – trikarboksilni ciklus, Thr – treonin, Trp – triptofan, Tyr – tirozin, Val – valin. Slika prilagođena prema (311).

Promjene u ljudskoj plazmi

Jedan od najčešćih opažanja u metaboličkim istraživanjima AB-a jest poremećaj metabolizma aminokiselina. U ovom istraživanju uočene su snižene razine različitih aminokiselina i njihovih derivata, uključujući prolin, valin, glicin, serin, treonin, sukcinsku, glutaminsku i piroglutaminsku kiselinu, kod osoba oboljelih od AB-a u usporedbi sa zdravim kontrolnim ispitanicima i ispitanicima s MCI-jem. U središnjem živčanom sustavu, aminokiseline, uključujući glutaminsku kiselinu, GABA-u, asparaginsku kiselinu i glicin, igraju ključnu ulogu u neurotransmisiji (126). Također, u AB-u dodatno su uočene promjene u metaboličkim putevima metionina, triptofana i tirozina, upućujući na njihov potencijal kao korisnih biomarkera za poboljšanu dijagnozu AB-a (312,313). U našem istraživanju, razine metionina su bile značajno niže u skupini AB skupini u usporedbi sa skupinom MCI, ali nije uočena značajna razlika između skupine AB i zdravih ispitanika. Slični rezultati dobiveni su i u serumu oboljelih od AB-a (292). Metionin, kao glavni izvor metilnih skupina, pretvara se u S-adenozilmetionin (SAM) koji dalje igra važnu ulogu u metilaciji DNA i histona, regulaciji neurotransmisije i lipidne homeostaze (314). U AB-u se poremećeni mehanizmi transmetilacije povezuju s niskim razinama SAM-a i metionina (292). Valin, leucin i izoleucin su aminokiseline razgranatih lanaca koje igraju važnu ulogu u sintezi proteina i ključne su za normalno funkcioniranje mozga (315). Nekoliko različitih istraživanja pokazalo je da u AB-u dolazi do pada u razinama ova tri metabolita (316–318). Snižene razine valina povezuje se s ubrzanim kognitivnim padom, što je u skladu s našim rezultatima (319). Iako u našem istraživanju nisu detektirani leucin i izoleucin, uočena je manja razina 2-ketoizokaproične kiseline, koja je metabolit leucina, u skupinama AB i MCI u odnosu na zdrave kontrolne ispitanike. Jedna od pretpostavki je da neuroni koriste razgranate lance ovih aminokiselina kao izvor energije kako bi nadoknadile poremećen energetskei metabolizam u AB-u (320). Posljedično, njihova koncentracija u krvi je značajno niža. Nadalje, ove aminokiseline prolaze krvno-moždanu barijeru i imaju ulogu u metabolizmu glutamata, gdje ih transaminaza BCAA koristi za njegovu sintezu (321). Glutamat je najzastupljenija aminokiselina u mozgu i glavni je ekscitatorni neurotransmiter u središnjem živčanom sustavu (322). Igra važnu fiziološku ulogu u razvoju mozga, učenju, pamćenju, senzornoj aktivnosti i sinaptičkoj plastičnosti (323). Promjene u glutamatergičnoj neurotransmisiji povezane su s kognitivnim poremećajima, poput AB-a (127), ishemijskog oštećenja mozga (128) i bolesti motornih neurona (129). Snižene razine glutamata smatraju se patološkim biomarkerom u mozgu osoba s AB-om (309,313,323–325). Promjene razina glutamata i glutamina u AB-u mogu odražavati poremećenu neurotransmisiju i ekscitotoksičnost glutamata (326). Nekoliko istraživanja također je uočilo smanjenu razinu glutamata kod ispitanika s AB-om ili MCI-jem, što je u skladu s rezultatima ovog istraživanja (309,325). Glutamat također djeluje

kao ključni posrednik između metabolizma ugljikohidrata i aminokiselina putem ciklusa TCA (327). Ciklus TCA predstavlja niz kemijskih reakcija i služi za stvaranje energije putem oksidacije acetil-CoA, koji potječe iz ugljikohidrata, masnih kiselina i proteina (328). Različite metabolomske studije pokazale su da u AB-u dolazi do promjena u ključnim metabolitima ciklusa TCA te glikolize (317,329). U ovom istraživanju, uočeno je progresivno smanjenje sukcinске, limunske i jabučne kiseline, od zdravih ispitanika, preko ispitanika s MCI-jem, do pojedinaca s dijagnozom AB-a. Sukladno ovome, i druga istraživanja također su uočila promjene u različitim metabolitima i intermedijima ciklusa TCA, uključujući i fumarinsku i 2-butandiočnu kiselinu, čije su razine bile snižene i kod AB-a i kod MCI-ja (309). Suprotno tome, jedno istraživanje je pokazalo da u AB-u dolazi do nakupljanja intermedijera ciklusa TCA, kao što je limunska kiselina, a razine jabučne kiseline su bile povišene u teškom stadiju demencije (319). Očuvana funkcija mitohondrija izuzetno je važna za normalno odvijanje ciklusa TCA. Međutim, uz patologiju AB-a često se vežu i oštećenja mitohondrija (330), što dovodi do smanjenog metabolizma glukoze, prekomjernog nakupljanja ROS-a i povećanog oksidativnog stresa (331). Stoga, promjene u razinama različitih intermedijera ciklusa TCA upućuju na mitohondrijsku disfunkciju, poremećaj redoks homeostaze i pojačani oksidativni stres (332).

Posljednjih godina AB se sve više ističe kao metabolička bolest pa se zbog toga često opisuje kao dijabetes tipa 3 (118). Poremećaj u metabolizmu glukoze smatra se jednim od pokazatelja progresije patoloških procesa u AB-u (333). Pokazano je da razina glukoze značajno snižena u hipokampusu i posteriornom cingulatu tijekom ranih faza bolesti (334,335). Rezultati metaboličkih istraživanja pokazala su da u ranim fazama demencije dolazi do nakupljanja ugljikohidrata, poput galaktoze, arabinitola, glicerola i fruktoze, te je put metabolizma ugljikohidrata značajno snižen u osoba oboljelih od demencije, što upućuje na smanjenu iskoristivost ugljikohidrata u AB-u (319). Nadalje, pokazano je da oboljeli od AB-a imaju smanjene koncentracije glukoznih transportera karakterističnih za središnji živčani sustav (336). Pretpostavlja se da je smanjena iskoristivost glukoze u mozgu jedan od najranijih događaja u AB-u te da se javlja čak i prije pojave patoloških i kliničkih obilježja bolesti (337). U ovom istraživanju identificirano je nekoliko ključnih metabolita čije razine su bile značajno promijenjene kod ispitanika s AB-om, upućujući na poremećenu iskoristivost glukoze i glikolitičkog puta u AB-u. Razina glukoze je bila značajno niža u skupini AB u odnosu na MCI, dok su fruktoza, glukozaminska i glicerinska kiselina bile značajno snižene u skupini AB u odnosu na zdrave i ispitanike s MCI-jem. Razine maltoze i izomaltoze, glavnih izvora glukoze, bile su povišene u AB-u i MCI-ju u usporedbi sa stanjem kojeg vidimo kod zdravim kontrolnim ispitanicima. Nakupljanje ovih disaharida može ukazivati na smanjenu sposobnost stanica za razgradnju glukoze (338). U uvjetima smanjene iskoristivosti glukoze u mozgu, dolazi do pomaka prema

ketogenom metabolizmu, gdje se kao glavni izvor energije koriste ketonska tijela, poput 3-hidroksibutirične kiseline i acetoacetata (339). U skladu s tim, u našem istraživanju razine acetoacetata su bile značajno povišene u AB-u u odnosu na druge skupine ispitanika, što bi moglo upućivati na pojačano korištenje alternativnih izvora energije. Povišene razine acetoacetata bi mogle odražavati adaptivni odgovor na smanjenu dostupnost glukoze. Ovi rezultati dodatno potvrđuju postojanje poremećaja u metabolizmu ugljikohidrata i energetske homeostazi u AB-u.

Promjene u mišjem modelu

Neciljanom metabolomskom analizom mišje plazme detektirano je nekoliko aminokiselina i njihovih derivata. Među značajnim aminokiselinama je triptofan, koji predstavlja esencijalnu aminokiselinu za sintezu serotonina, melatonina i metabolita kinureninskog puta (340). Triptofan i njegov metabolit indolmliječna kiselina, koja ima protuupalna i imunomodulacijska svojstva, bili su značajno sniženi u skupini 3xTg-AD u odnosu na kontrolne miševe. U sličnom metabolomskom istraživanju na miševima 3xTg-AD utvrđene su snižene razine i drugih metabolita uključenih u metabolizam triptofana, uključujući serotonin i N-acetil-5-hidroksitriptamin (341). Slični rezultati zabilježeni su i kod ljudi, gdje su utvrđene snižene razine triptofana (317), serotonina i njegovih receptora u serumu i CSF-u na post-mortem uzorcima mozga bolesnika s AB-om (342,343). Poremećaj u serotoninском sustavu povezuje se s pojačanim upalnim odgovorom povezanim s prisutnošću oligomera A β (344). Smatra se da nakupljanje amiloidnih plakova može potaknuti upalni odgovor praćen poremećenim metabolizmom triptofana (344). Početna degeneracija serotoninškog sustava može potaknuti širenje patoloških promjena u AB-u, a sve veći broj istraživanja pokazuje da bi to mogao biti jedan od ranih obilježja AB-a (345). U plazmi miševa detektiran je tripeptid sastavljen od aminokiselina fenilalanina, alanina i arginina, čija je razina bila značajno viša u skupini 3xTg-AD u odnosu na kontrolnu skupinu. Zanimljivo je da značajno poremećena proteosomalna funkcija predstavlja jedan od ranijih događaja u AB-a, pri čemu se poremećaj dodatno produbljuje napredovanjem bolesti (346). Poremećena funkcija proteosoma sugerira smanjenu proteolitičku aktivnost i nepotpunu razgradnju proteina, uzrokujući nakupljanje kratkih dipeptida i tripeptida (347). U plazmi miševa 3xTg-AD detektirane su snižene razine metabolita poput glicina, alotreonina, propionske i glutaminske kiseline, no samo je glicin bio statistički značajno promijenjen. Slično tome, metabolomskim istraživanjem provedenim na serumu miševa 3xTg-AD detektirano je i identificirano 256 ciljanih metabolita koji su uglavnom bili uključeni u biosintezu aminoacil-tRNA, biosintezu arginina, metabolizam serina, glicina i arginina, metabolizam aspartata i glutamata te purinski i pirimidinski metabolizam (341).

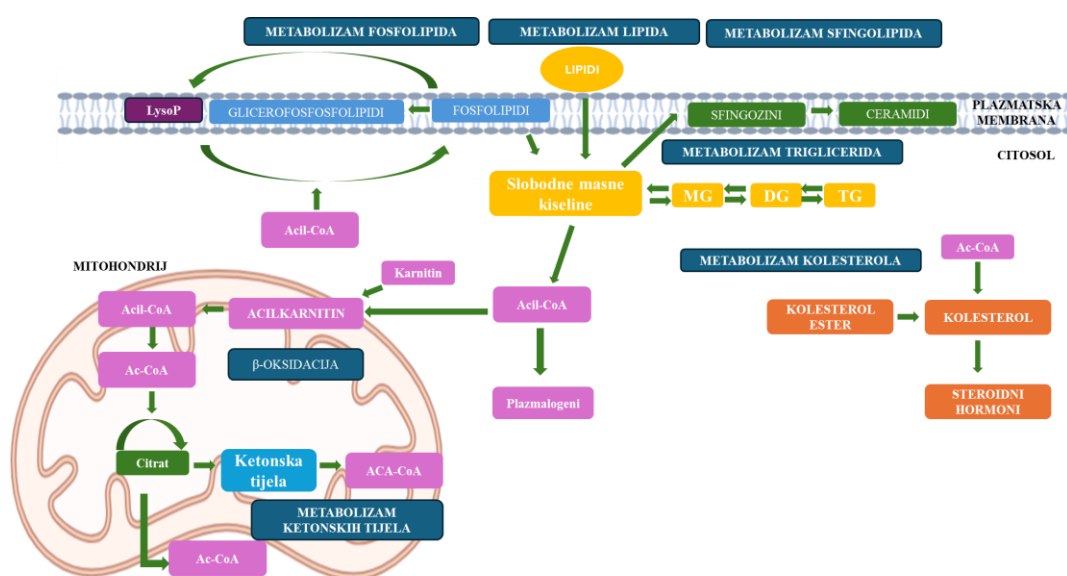
U prefrontalnom korteksu mišjeg modela AB-a detektirano je nekoliko metabolita koji pripadaju skupini aminokiselina i njihovih derivata, međutim nijedan od identificiranih metabolita nije postigao značajnost nakon korekcije FDR. U istraživanju provedenom na transgeničnom mišu TgCRND8 provedena je ^1H NMR spektroskopija na 8 različitih regija mozga, među kojima su bili i korteks i hipokampus (348). Rezultati ovog istraživanja pokazala su snižene razine N-acetil-aspartata, glutamata, glutamina i GABA-e. N-acetil-aspartat predstavlja biomarker zdravlja neurona, aksonalne vijabilnosti i gustoće (349), dok je GABA ključni inhibicijski neurotransmiter. Oba ova metabolita, detektirana su i u prefrontalnom korteksu mišjeg modela AB-a te su njihove razine bile snižene u usporedbi s kontrolnim miševima, ali bez statističke značajnosti nakon korekcije FDR korekcije. Snižene razine N-acetil-aspartata u skladu su s drugim istraživanjima i na ljudskim post-mortem uzorcima mozga (350,351) te na kortikalnim prerezima mišjih modela AB-a (348,352). Slično tome, snižene razine GABA-e uočene su u frontalnom korteksu bolesnika s AB-om (353).

Na mišjem modelu bolesti uočen je poremećaj u ciklusu TCA, koji se očituje promijenjenim razinama ključnih metabolita i intermedijera ovog metaboličkog puta. U prefrontalnom korteksu miševa 3xTG-AD uočene su povišene razine limunske i jabučne kiseline u odnosu na kontrolne mišve. Suprotno tome, metabolomskim istraživanjem provedenim na prerezima hipokampusa miševa 3xTg-AD detektirane su snižene razine limunske kiseline, cis-akonitata, jabučne kiseline, sukcinata, fumarata i α -ketoglutarata (329). U hipokampusu miševa 5xFAD, starih 4 mjeseca, uočena je smanjenu aktivnost ciklusa TCA, što se očituje smanjenim omjerima aspartata, citrata i fumarata (354). Suprotno tome, cerebralni korteks istih miševa pokazuje povećanu aktivnost ciklusa TCA, s povećanim omjerima aspartata, limunske kiseline, fumarata, glutamata i glutamina. Ovakav rezultat sugerira regionalno diferencirani metabolički fenotip (354). Stoga porast razina metabolita ciklusa TCA može ukazivati na kompenzacijski porast metabolizma vezanog za ciklus TCA u određenim regijama mozga (354). Također, u prefrontalnom korteksu miševa 3xTg-AD uočene su povišene razine vitamina B5. Vitamin B5 je prekursor koenzima A, koji je esencijalni faktor uključen u brojne metaboličke reakcije, poput sinteze fosfolipida, sinteze i razgradnje masnih kiselina te funkcioniranje ciklusa TCA (355). Međutim, većina istraživanja navodi da smanjene razine ovog metabolita mogu biti uzrok neurodegeneracije u AB-u, Parkinsonovoj bolesti i Huntingtonovoj bolesti (356). Ovaj pad zabilježen je post-mortem u regijama mozga osoba s AB-om, poput hipokampusa, entorinalnog korteksa i srednjeg temporalnog girusa (357). Povišene razine vitamina B5 u prefrontalnom korteksu miševa 3xTg-AD vjerojatno odražava kompenzacijski mehanizam mozga kojim se nastoji održati lipidna homeostaza u ranoj fazi patologije AB-a.

U posljednje vrijeme laktat se ističe kao ključni metabolit odgovoran za održavanje pamćenja (358). Laktat je krajnji produkt aerobne glikolize koji se odvija u astrocitima te sve više dokaza upućuje na to da su proizvodnja i njegov transport između astrocita i neurona nužni za formiranje pamćenja (359). Laktat je također identificiran kao nova signalna molekula u mozgu odgovorna za regulaciju sinaptičke plastičnosti (360). Harris i suradnici (358) su ispitali odnos između razine laktata u mozgu i pamćenja u APP/PS1 mišjem modelu AB-a. Uočeno je smanjenje razina laktata u frontalnom korteksu kontrolnih miševa ovisno o dobi, dok se kod miševa APP/PS1 razine nisu značajno mijenjale između 3. i 12. mjeseca starosti. Analizom intersticijske tekućine hipokampusa uočen je značajni porast razine laktata kod miševa APP/PS1 u odnosu na kontrolne miševe u dobi od 12 mjeseci. Kod kontrolnih miševa, povećanje ekspresije enzima koji proizvode laktat korelirala je s boljim rezultatima pamćenja. Međutim, kod miševa APP/PS1 uočen je suprotan efekt, odnosno, kod njih je povećana ekspresija enzima koji proizvode laktat korelirala s lošijim pamćenjem (358). Autori ističu da je proizvodnja laktata, putem aerobne glikolize, korisna za funkciju pamćenja tijekom normalnog starenja (358). Međutim, povišene razine kod miševa APP/PS1 upućuju na poremećenu obradu laktata, što može doprinijeti kognitivnom padu u AB-u. U novijem istraživanju, provedenom na hipokampusu miševa 3xTg-AD, uočene su pak niske razine laktata sugerirajući poremećaj glikolitičkog ciklusa (361). Dodatno, suplementacija L-laktatom vraća normalne razine laktata u mozgu i značajno poboljšava pamćenje, dugotrajnu potencijaciju i sinaptičku strukturu (361). U našem istraživanju u plazmi miševa 3xTg-AD uočena je značajno snižena razina mliječne kiseline u usporedbi s kontrolnim miševima. Uzimajući u obzir porast razina markera ketogeneze, 3-hidroksibutirata (iako nije bilo značajnosti nakon FDR korekcije), ovi rezultati upućuju na potencijalni poremećaj glikolize i energetskog metabolizma te pomak prema ketonskom metabolizmu. Uz poremećaj energetskog metabolizma, sve veći broj istraživanja upućuje i na promjene u purinskom metabolizmu (362,363). Hipoksantin je intermedijer razgradnje purinskih nukleotida, čije se visoke razine povezuju s pojačanim razgradnjom ATP-a i prisutnošću energetskog stresa (364). Razine hipoksantina u prefrontalnom korteksu miševa 3xTg-AD bile su povišene u usporedbi s kontrolnim miševima, a slične rezultate pokazali su i Esteve i suradnici (365), gdje su u mozgu miševa 3xTg-AD, uz povišene razine hipoksantina, uočili i povećane razine ksantina i mokraćne kiseline, ključnih metabolita purinskog metabolizma.

5.2. Promjene u metabolizmu lipida u AB-u

Lipidi predstavljaju raznoliku skupinu biomolekula koje su strukturno i funkcionalno uključene u široki spektar različitih staničnih procesa i funkcija u tkivu. Nakon masnog tkiva, mozak je drugi najveći organ u tijelu s najvećim udjelom lipida (366). Glavne vrste lipida u mozgu se mogu podijeliti na fosfolipide, sfingolipide, glicerolipide, masne kiseline i sterole (Slika 48.). Metabolizam lipida povezan je s više neuropatoloških procesa AB-a, uključujući stvaranje amiloidnih plakova, neuroupalu, oksidativni stres, bioenergetski deficit i degeneraciju mijelina (367–370).



Slika 48. Shematski prikaz metabolizma lipida.

Ac-CoA – acil koenzim A, ACA-CoA – acetoacil koenzim A, DG - diacilgliceridi, LysoP – lizofosfolipidi, MG – monoacilgliceridi, TG – triacilgliceridi

Prilagođeno prema <https://reactome.org/PathwayBrowser/#/R-HSA-556833&PATH=R-HSA-1430728> (pristupljeno 05.01.2026).

5.2.1. Masne kiseline i glicerolipidi

Promjene u ljudskoj plazmi

Masne kiseline se dijele prema stupnju zasićenosti, odnosno broju dvostrukih veza, na zasićene i nezasićene masne kiseline. Nezasićene masne kiseline se dijele na monozasićene i polinezasićene masne kiseline, pri čemu se polinezasićene dodatno

dijele u dva razreda: omega-3 i omega-6 masne kiseline. Masne kiseline su prisutne u visokim razinama u neuronima te djeluju kao bioaktivne molekule igrajući važnu ulogu u staničnoj strukturi i prijenosu signala (371). Promjene u zastupljenosti nezasićenih masnih kiselina u više su studija povezane s AB-om (372). U tim istraživanjima utvrđeno je da su razine masnih kiselina, uključujući omega-3 masne kiseline i oleinsku kiselinu, niže u mozgu (osobito u korteksu) i plazmi osoba s AB-om u usporedbi s kognitivno zdravim kontrolama (136,342). U našoj analizi na ljudskoj plazmi, primjenom metoda LC-MS i GC-MS, identificirano je nekoliko masnih kiselina (eikozatetraenoinska, dodekenoinska, dodekendionska i 9-HODE). Njihove razine su bile značajno niže u skupini ispitanika s MCI-jem u odnosu na zdrave kontrole, dok u slučaju usporedbe skupine AB sa zdravim ispitanicima, isti trend je vidljiv kod svih masnih acila, osim u slučaju dodekenoinske kiseline čija je zastupljenost u skupini AB bila višestruko povišena u odnosu na skupinu zdravih ispitanika. 9-HODE je metabolit linolne kiseline, koja je omega-6 masna kiselina. Linolna kiselina doprinosi polimerizaciji proteina tau i A β (373). Štoviše, pokazano je da su njezine razine značajno niže u ispitanika s AB-om ili MCI-jem u usporedbi s kontrolnom skupinom (136). Niske razine linolne kiseline povezuju se s povećanom razinom proupalnog metabolita, arahidonske kiseline (137). Promjene u razinama mnogih drugih masnih kiselina zabilježene su u AB-u, uključujući oleinsku, stearinsku, palmitinsku i, jednu od najzastupljenih polinezasićenih masnih kiselina u mozgu, DHA. Snowden i suradnici (373) utvrdili su značajnu razliku u razinama linolenske, DHA, EPA, oleinske i arahidonske kiseline u mozgu oboljelih od AB-a u usporedbi s kontrolnom skupinom. Brojna istraživanja su analizirala razine masnih kiselina u mozgu, plazmi i serumu ispitanika s AB-om, ali s kontradiktornim rezultatima (136,374). Razlozi različitih rezultata mogu ležati u eksperimentalnim postavkama i analitičkim platformama primijenjenima u istraživanjima, tipu uzorka te protokolima koji su se koristili za izdvajanje lipida.

Ovisno o broji acilnih grupa u strukturi, glicerolipidi se dijele na monogliceride (MG), diacilgliceride (DG) i trigliceride (TG). Ovi lipidi imaju ključnu ulogu u energetskom metabolizmu i staničnoj signalizaciji (375). Nekoliko lipidomskih i metabolomskih studija uočilo je poremećaj u metabolizmu glicerolipida u neurodegenerativnim bolestima, uključujući i AB. Pokazano je da su razine MG-a i DG-a povišene u prefrontalnom korteksu i u plazmi ispitanika s AB-om i MCI-jem (376,377), dok razine TG-a nisu promijenjene (376,378). Wood i suradnici (376) su u svom radu istaknuli kako bi visoke razine ovih glicerolipida mogle biti rani događaj u patologiji AB-a. Dodatno, detektirane su povišene razine MG-a i DG-a u sivoj tvari ispitanika s MCI-jem i bolesnika s dijagnozom AB-a, što sugerira da ove promjene mogu imati ulogu u razvoju MCI-ja, kao i prijelazu iz MCI-ja u AB (379). Međutim, u ovom istraživanju detektirana su tri spoja iz skupine MG, od kojeg

je samo MG(0:0/18:1/0:0) bio značajno snižen u skupini AB u usporedbi s kontrolnom skupinom, pri čemu nisu utvrđene značajne razlike između skupina AB i MCI.

Steroidni lipidi predstavljaju važne komponente u patofiziologiji AB-a čija se uloga intenzivno proučava, no metabolomski podaci su zasad i dalje ograničeni. DHEA, odnosno DHEAS, je neurosteroid koji je uključen u brojne procese poput regulacije imunološkog sustava, učenja, pamćenja, regulacije emocija, tjelesnog rasta i razvoja (1). Razine neurosteroida DHEA i DHEAS znatno opadaju starenjem, ali taj pad je vidljiv i u neurodegenerativnim bolestima, uključujući AB (1). DHEA(S) se povezuje s padom kognitivne funkcije, kao i s povećanom stopom neuronske degeneracije i disfunkcije koja se javlja tijekom starenja i neurodegenerativnih procesa (199). U našem istraživanju, DHEAS je bio manje zastupljen u AB-u i MCI-ju u usporedbi sa zdravim kontrolama, ali nisu utvrđene značajne razlike između AB-a i MCI-ja. Brojna druga istraživanja su također potvrdila smanjene razine neurosteroida DHEA(S) u plazmi oboljelih od AB-a (219,380–382). Međutim, postoji nesklad između razina steroidnih hormona u cirkulaciji i onih koje su zabilježene u mozgu, budući da su neke studije izvijestile o povišenim razinama u mozgu bolesnika s AB-om (208,383). Jedna od pretpostavki je da povišene razine neurosteroida DHEA u mozgu predstavljaju odgovor na pojačani oksidativni stres induciran prisutnošću amiloidnih plakova u AB-u. Zbog navedenog se DHEA zadržava u mozgu, pri čemu se njegova razina u cirkulaciji smanjuje (382).

Promjene na mišjem modelu

U plazmi i prefrontalnom korteksu mišjeg modela bolesti detektiran je veći broj masnih kiselina. Metodama LC-MS i GC-MS detektirani su oleinska, palmitinska i 9-oktadekanska kiselina u plazmi miševa 3xTg-AD, dok su oleinska i stearinska kiselina identificirani i u prefrontalnom korteksu ovih miševa. Razine ovih metabolita su bile značajno povišene kod miševa 3xTg-AD u odnosu na kontrolnu skupinu. Palmitinska i 9-oktadekanska kiselina su zasićene masne kiseline koje potiču proupalnu aktivaciju mikroglija, aktivirajući put transkripcijskog faktora NF- κ B i povećanu proizvodnju proupalnih citokina, IL-1 β , IL-6, TNF- β te ROS-a (384). Dodatno, predloženo je i da povišene razine ovih zasićenih masnih kiselina igraju središnju ulogu u pokretanju kaskade događaja koji dovode do patofizioloških promjena povezanih s AB-om (385). Naime, istraživanje provedeno na primarnoj kulturi štakorskih neurona pokazalo je da povišene razine masnih kiselina doprinose hiperfosforilaciji proteina tau (385) i agregaciji A β filamenata (386). Oleinska kiselina je mononezasićena masna kiselina za koju se smatra da pokazuje protektivna svojstva i smanjuje rizik za razvoj AB-a (387). Naime, povišene razine oleinske kiseline smanjuju rizik za razvoj AB-a, MCI-a i progresiju iz MCI-ja u AB (388). Nadalje, na

in vitro modelima pokazano je da dodatak oleinske kiseline smanjuje razine A β , a ovi rezultati su potvrđeni i na transgeničnom mišjem modelu AB-a u situaciji kada su životinje dobivale hranu bogatu oleinskom kiselinom (387). U kliničkom istraživanju pokazano je da su pacijenti koji su imali prehranu bogatu maslinovim uljem, glavnim izvorom oleinske kiseline, imali bolje kognitivne funkcije u usporedbi s kontrolnom skupinom (389). *In vitro* istraživanja su pokazala da izlaganje oleinskoj kiselini, prije izlaganja palmitinskoj kiselini, potpuno blokira patološke signale koje palmitat izaziva u neuronskim stanicama, poput mitohondrijske disfunkcije i proizvodnje proupalnih NF- κ B signala (390,391). Ova istraživanja potvrđuju zaštitni učinak oleinske kiseline protiv palmitinske toksičnosti koja se povezuje s neurodegeneracijom. U kontekstu naših rezultata, povišene razine oleinske kiseline bi mogle biti odgovor na štetne učinke visokih razina zasićenih masnih kiselina, palmitinske i stearinske kiseline.

U plazmi miševa identificiran je i glicerolipid, MG(18:4/0:0/0:0), čije su razine bile značajno povišene u skupini 3xTg-AD u usporedbi s kontrolnom skupinom. Ovo je u skladu s literaturnim nalazima gdje je predloženo da povećane razine glicerolipida mogu biti jedan od ranih događaja u patologiji AB-a (376). Slično istraživanje provedeno na transgeničnom modelu AB-a APP/PS1 utvrdilo je povišene razine različitih MG-a u plazmi i hipokampusu miševa (392). Nadalje, kod miševa 3xTg-AD uočen je i porast razina FAHFA(24:4/0:0/0:0) u usporedbi s kontrolnim miševima. FAHFA su esteri masnih kiselina vezani na hidroksilne masne kiseline čije uloge još nisu u potpunosti razjašnjene, no pokazano je da ostvaruju imunomodulacijske efekte, djelujući kao lipidni medijatori u brojnim metaboličkim procesima (393). Lipidi FAHFA pokazuju antioksidativna svojstva aktivacijom transkripcijskog faktora Nrf2 i povećanjem aktivnosti antioksidativnih enzima (393). Stoga je moguće da ove molekule, modulirajući upalu i oksidativni stres, neizravno sudjeluju u procesu neurodegeneracije, ili da promjene u njihovim razinama predstavljaju adaptivni odgovor na druge patološke promjene u AB-u (394).

Acilkarnitini su uključeni u oksidaciju masnih kiselina i metabolizam aminokiselina razgranatih lanaca (395), te su literaturni podaci o njihovim razinama u AB-u različiti, ovisno o istraživanju (396–398). U ovom istraživanju utvrđene su povišene plazmatske razine linoleilkarnitina i tetradekenilkarnitina kod skupine 3xTg-AD. Druga istraživanja na animalnim modelima, ističu kako su razine različitih acilkarnitina snižene u hipokampusu, korteksu i cerebelumu transgeničnih miševa APP/PS1 (292). Serumske razine različitih vrsta acilkarnitina, među kojima su i tetradekenilkarnitin i linoleilkarnitin, pokazali su trend smanjenja, počevši od zdravih ispitanika do osoba s prisutnim blagim kognitivnim oštećenjem i razvijenim AB-om (398).

Mozak sadrži 25% ukupnog kolesterola te se većina sintetizira *de novo* u mozgu (399). Iako je kolesterol nužan za ključne fiziološke funkcije mozga, poput sinaptičke

plastičnosti, učenja i pamćenja, noviji dokazi upućuju na ulogu moždanog kolesterola u patofiziologiji AB-a (400). Postoji nekoliko dokaza koji upućuju na izravnu uključenost neuronalnog kolesterola u AB-u. Primjerice, pokazano je da protein APP posjeduje fleksibilnu transmembransku domenu sposobnu za vezanje na kolesterol, čime se implicira uloga neuronalnog kolesterola u amiloidogenom procesiranju (401). Dodatna novija istraživanja sugeriraju katalitičku ulogu kolesterola u agregaciji A β -42 (402) te da je proizvodnja A β u neuronima regulirana sintezom kolesterola i transportom iz astrocita koji je posredovan proteinom ApoE (403). Zajedno, ovi nalazi podupiru uključenost neuronalnog kolesterola u nastanak amiloidnih plakova. Većina istraživanja navodi da su razine cirkulirajućeg kolesterola i kolesterola u mozgu povišene u AB-u (404–406), iako su, prema nekim literaturnim podacima, razine kolesterola nepromijenjene što bi moglo biti povezano s činjenicom da su istraživanja provedena na različitim regijama mozga, odnosno u različitim stadijima bolesti (407,408). Povećane razine kolesterola uočene su i u senilnim plakovima ljudskog mozga, a njegove razine u mozgu se povezuju s napredovanjem AB-a (404). Metodom GC-MS identificirane su povišene razine kolesterola u plazmi i prefrontalnom korteksu miševa 3xTg-AD u usporedbi s kontrolnom skupinom, što ukazuje na poremećaj kolesterolne homeostaze u ovom transgeničnom modelu AB-a. Visoke razine kolesterola u prefrontalnom korteksu, odgovornom za kognitivne funkcije koje su značajno narušene u AB-u, može pridonositi akumulaciji peptida A β . Dodatno, visoke razine u plazmi mišjeg modela AB-a sugeriraju i na perifernu neravnotežu u metabolizmu kolesterola, a te povišene razine kolesterola mogle bi biti odgovor na prisutnu moždanu patologiju.

5.2.2. Glicerofosfolipidi

Promjene na ljudskoj plazmi

Glicerofosfolipidi su sastavni dio staničnih membrana i imaju ključnu ulogu u brojnim biološkim procesima, poput metaboličkih reakcija, transporta, unutarstanične organizacije, transmembranskog signaliziranja, apoptoze, a ujedno čine i barijeru između citosola i izvanstaničnog okoliša (409). Mozak i neuronske membrane sadrže velike količine glicerofosfolipida, zajedno s kolesterolom i drugim glikolipidima (410). Glicerofosfolipidi su polarni lipidi koji se sastoje od fosfatne skupine, koja doprinosi njihovoj hidrofilnosti, te dviju masnih kiselina, koje doprinose njihovoj hidrofobnosti, vezanih za alkohol glicerol. Ovisno o dodatnoj polarnoj skupini (kolin, serin, etanolamin, inozitol) vezanoj na fosfat, glicerofosfolipidi se dijele na fosfatidilkoline (PC), fosfatidilserine (PS), fosfatidiletanolamine (PE), fosfatidilinozitoles (PI). Dodatno, enzimskom aktivnošću uključenom u metabolizam glicerofosfolipida nastaju i drugi

derivati, poput lizofosfolipida, koji sadrže samo jednu masnu kiselinu i jednu polarnu skupinu.

U našem istraživanju, u ljudskoj plazmi identificirano je nekoliko različitih glicerofosfolipida, čije su razine bile značajno niže u skupinama AB i MCI u odnosu na kontrolnu skupinu, a trend pada je vidljiv i s napretkom kognitivnog oštećenja, odnosno, u usporedbi skupina MCI i AB. Među ovim metabolitima, za PC(O-12:0/2:0), LysoPC(14:0), LysoPC(16:0) i PI(18:0/22:0) vidljivo je kako njihove razine padaju od zdravih kontrolnih ispitanika, preko ispitanika s MCI-jem do skupine AB. Dobiveni rezultat bi mogao sugerirati da ovi metaboliti imaju potencijalnu prognostičku vrijednost. Većina dosadašnjih istraživanja vezano za metabolizmu lipida izvijestila je o sniženim razinama PC-a u AB-u ili MCI-ju (411–414). Niže razine PC-a povezuju se s padom kognitivnih funkcija i smanjenom aktivnošću kortikalnih neurona tijekom normalnog starenja, osobito u unutarnjem olfaktornom korteksu (415). Oštećenje moždanih membranskih fosfolipida može pridonijeti patogenezi AB-a, što vodi ionskoj nestabilnosti i oksidativnom stresu (416,417). Produkti koji nastaju njihovom razgradnjom dodatno aktiviraju mikrogliju i upalne citokine, čime se dodatno pojačavaju oksidativni stres i upala, koji predstavljaju ključne procese u AB-u (416). Međutim, mehanizmi koji reguliraju nastanak i obnavljanje fosfolipida još uvijek nisu u potpunosti poznati. Smanjene razine PC-a se povezuju s narušenom aktivnošću enzima fosfolipaze A2 (PLA2). PLA2 je ključni enzim u metabolizmu membranskih fosfolipida, a osim toga uključen je i u procesiranje te sekreciju proteina APP, ključnog u stvaranju amiloidnih plakova (418). Pokazano je da aberantna funkcija ovog enzima, kao i njegova snižena razina, mogu doprinijeti stvaranju amiloidnih peptida, što u konačnici rezultira njihovim nakupljanjem u obliku plakova (418). Uz smanjenu aktivnost enzima PLA2, uočena je pojačana aktivnost enzima (50-70%) koji recikliraju lizofosfolipide i vraćaju fosfolipidne katabolite za resintezu fosfolipida (419). Nadalje, u ovom istraživanju detektirane su snižene razine različitih lizofosfolipida, poput LysoPC (18:1), LysoPC (15:0), LysoPC(16:1), lysoPE(18:1) i lysoPE(18:0), što je u skladu i s drugim istraživanjima provedenim koristeći uzorke plazme (419–421) i CSF-a oboljelih od AB-a (422). Suprotno ovome, nekoliko studija zabilježilo je povišene razine lizofosfolipida u AB-u. Grimm i suradnici (423) su pokazali povišene post-mortem razine LysoPC-a u mozgu oboljelih od AB-a. Jedno longitudinalno istraživanje, provođeno tijekom razdoblja od 7-9 godina, utvrdilo je porast četiri vrste PC-a tijekom MCI faze te porast pet vrsta PC-a u trenutku kada su kognitivno zdrave osobe prešle u fazu AB-a (424). Ova neslaganja u dobivenim rezultatima mogu biti posljedica primjene različitih lipidomskih analitičkih tehnika i platformi, kao i uključivanja većeg broja osoba s blagim oblikom AB-a, uz dodatni utjecaj dugog razdoblja praćenja, koje može dovesti do promjena lipidnog profila u plazmi (424). Promjene u razinama PC-a mogu ovisiti i o tipu masnih kiselina koje su vezane na njih, a uočeno je i snižavanje polinezasićenih PC-

a te povišenje zasićenih PC-a (420). Sastav masnih kiselina u sklopu membranskih lipida utječe na njihova biofizička svojstva, uključujući fluidnost, propusnost i električni naboj (425). Stoga gubitak potencijalno važnih nezasićenih masnih kiselina doprinosi oštećenju membrana, procesu koji je vidljiv i u patogenezi AB-a (420). Autori također ističu i snižene razine nekoliko vrsta lysoPE, među kojima je i lysoPE(18:1), koji je detektiran i u našem istraživanju. Snižene razine lipida lysoPE povezuje se s oksidativnim stresom koji je prepoznat kao jedan od ključnih čimbenika u patogenezi AB-a, pogotovo s obzirom na visoku metaboličku aktivnost mozga koja ga čini posebno osjetljivim na djelovanje ROS-a (426). Zbog slabih mehanizama antioksidativne obrane moždanog tkiva, visoka koncentracija polinezasićenih masnih kiselina obično služi kao supstrat za lipidnu peroksidaciju, što dovodi do stvaranja reaktivnih aldehida koji oksidiraju proteine i inhibiraju glikolitičke procese (427). Oksidativni stres tako doprinosi destabilizaciji membrana i degradaciji polinezasićenih fosfolipida, pridonoseći patologiji AB-a (420).

Promjene na mišjem modelu

Neciljanom metabolomskom analizom plazmi i tkiva prefrontalnog korteksa miševa 3xTg-AD pomoću metode LC-MS identificiran je veliki broj glicerofosfolipida i lizofosfolipida. Tijekom remodeliranja membranskih fosfolipida, lizofosfolipidi nastaju enzimatskom aktivnošću enzima PLA2 te se potom aciliraju s acil-CoA u ciklusu deacilacije-reacilacije, poznatom kao Landsov ciklus, kako bi se održao normalan i esencijalan sastav neuronskih membrana (409). Međutim, lizofosfolipidi nisu samo međuprodukti u metabolizmu glicerida, već djeluju i kao pro-upalni medijatori u brojnim neuronskim signalnim putevima uključenim u neuroupalu i oksidativni stres (428,429). U ovom istraživanju u mišjoj plazmi detektiran je veliki broj lizofosfolipida, uključujući različite lysoPC, lysoPE i lysoPI. Većina ovih metabolita bila je značajno povišena u skupini 3xTg-AD u usporedbi s kontrolnim miševima, dok je samo lysoPC(15:0) bio značajno snižen. Suprotno ovome, istraživanje provedeno na transgeničnim miševima APP/PS1 pokazalo je smanjene razine različitih lizofosfolipida u plazmi mišjeg modela AB-a različite dobi (2, 3 i 7 mjeseci) (430). Lipidomska istraživanja provedena na mozgu različitih mišjih modela AB-a, pokazala su statistički značajne razine različitih vrsta lipida između miševa s patologijom AB-a i kontrolnih životinja. Konkretno, kod mišjeg modela AB-a, u usporedbi s divljim tipom, zabilježeno je povećanje zastupljenosti gangliozida (377), sfinogmijelina (431), (432), lizofosfolipida (433) i mononezasićenih masnih kiselina (308,434), dok je uočen pad sulfatida (432). Međutim, važno je naglasiti da su ova istraživanja provedena pod različitim eksperimentalnim uvjetima i na različitim modelima bolesti, uključujući APP/PS1 (429,431,435), Tg2576 (377), 5xFAD (436), SAMP8 (308), 3xTg-AD (407), pri čemu je APP/PS1 najčešće korišten model u istraživanjima AB-a. Većina istraživanja je

provedena na cijelom mozgu (436,437), dok je samo mali broj studija analizirao specifične regije mozga, primjerice korteks (432) i hipokampus (407). Dodatno, razlike u stadiju bolesti i spolu životinja također mogu utjecati na lipidni sastav.

Za razliku od većine transgeničnih modela AB-a koji se temelje isključivo na amiloidnoj patologiji, miševi 3xTg-AD razvijaju i amiloidne plakove i nakupine proteina tau. Nedavno je istraživanje pokazalo da dolazi do prekomjerne aktivacije enzima PLA2 u prisutnosti tau oligomera u cerebralnom korteksu i hipokampusu miševa 3xTg-AD (438). Prekomjerna aktivacije ovog enzima rezultira pojačanom hidrolizom membranskih fosfolipida oslobađajući arahidonsku kiselinu i lizofosfolipide (439). Ovi bioaktivni lipidni medijatori u fiziološkim uvjetima doprinose održavanju stanične homeostaze, a kada su deregulirani, sudjeluju u neuroupali i oksidativnom stresu (440). Arahidonska kiselina je omega-6 polinezasićena masna kiselina te je ključni prekursor upalnih medijatora, poput prostaglandina i leukotriena, čija je sinteza pojačana u uvjetima kronične neuroupale (441). Stoga povećana razina arahidonske kiseline u sastavu lizofosfolipida može odražavati stanje pojačanog upalnog procesa i oksidativnog stresa u miševima 3xTg-AD (438). U našem istraživanju uočene su povećane razine lysoPC(20:4) u tkivu i plazmi miševa 3xTg-AD u usporedbi s kontrolnim miševima. Dodatno, povećane razine ovog metabolita mogu upućivati i na poremećaj u funkcioniranju Landsovog ciklusa (441). U tom ciklusu arahidonska kiselina se oslobađa iz membranskih fosfolipida djelovanjem PLA2, a zatim se ponovno esterificira u membranske fosfolipide putem lizofosfolipidnih aciltransferaza (442). Stoga, nakupljanje lizofosfolipida u AB-u može upućivati na poremećaj u ciklusu remodeliranja membranskih fosfolipida.

U plazmi su detektirani lysoPC koji u svom sastavu sadrže DHA i eikozapentaenska kiselina (EPA), lysoPC (22:6) i lysoPC(20:5), a njihove razine su bile povišene kod miševa 3xTg-AD u usporedbi s kontrolama. Slično istraživanje, provedeno na mišjem modelu APP/Tau, također je utvrdilo povišene razine ovih metabolita u presimptomatskoj fazi AB-a u usporedbi s kontrolnim miševima (443). Autori ističu kako lizofosfolipidi nisu samo nusprodukti razgradnje membrana već imaju ključnu ulogu prijenosnika masnih kiselina, osobito prema mozgu. Masne kiseline DHA i EPA ne mogu samostalno prijeći krvno-moždanu barijeru već se prenose vezane na lizofosfolipide (444). Dakle, povišene razine u plazmi u ranom stadiju bolesti mogu upućivati na to da organizam nastoji kompenzirati patološke promjene u mozgu na način da povećava dotok ovih neuroprotektivnih masnih kiselina (444). Međutim, još uvijek nije u potpunosti jasno koliko se plazmatski lizofosfolipidi stvarno ugrađuju u moždane fosfolipide (443). Konačno, istodobni porast glicerofosfolipida, osobito onih koji sadrže polinezasićene masne kiseline, u plazmi i tkivu, upućuje na to da su promjene u metabolizmu lipida sustavne. Ovo podržava ideju

da se takve promjene mogu mjeriti na periferiji, te da glicerofosfolipidi mogu predstavljati rane biomarkere AB-a (445,446).

5.3. Ostale promjene u AB-u

Oksidativni stres se smatra jednim od ključnih događaja u razvoju mnogih neurodegenerativnih bolesti, uključujući i AB-a (447). Oksidativni stres u AB-u potiče agregaciju peptida A β i hiperfosforilaciju proteina tau, što uzrokuje disfunkciju sinapsi i neurotoksičnost. Uočeno je da se većina biomarkera oksidativnog stresa nalazi u sinapsama neurona, što potvrđuje da oksidativni stres oštećuje sinapse i narušava neurotransmisiju (448). Neciljanom metabolomskom analizom u plazmi oboljelih od AB-a identificirano je nekoliko markera oksidativnog stresa. Jedan od njih je hipurna kiselina, koja nastaje razgradnjom polifenola i aromatskih aminokiselina pod utjecajem crijevne mikrobiote, a zatim se formira konjugacijom benzoične kiseline s glicinom te se izlučuje u urinu (449). Hipurna kiselina se povezuje s narušenom ravnotežom redoks procesa i nakupljanjem ROS-a (450,451). Nadalje, postoji nekoliko metabolomskih studija koje predlažu hipurnu kiselinu kao biomarker starenja, budući da su razine ovog metabolita pronađene u krvi i urinu starijih ispitanika s bolestima povezanim sa starenjem i kognitivnim oštećenjem (318,452,453). U našem istraživanju uočena je snižena razina benzoične kiseline kod ispitanika s MCI-jem u usporedbi s kontrolnom skupinom, dok su razine hipurne kiseline bile povišene kod osoba s MCI-jem u odnosu na zdrave ispitanike i osobe s AB-om. Sličan trend uočili su i Trushina i suradnici (454) koji su identificirali povišenu razinu hipurne kiseline u plazmi ispitanika s MCI-jem u usporedbi s kontrolnom skupinom. Na temelju ovih nalaza predloženo je da bi hipurna kiselina mogla predstavljati potencijalni biomarker za detekciju osoba s kognitivnim oštećenjem, uključujući i MCI (326,454,455).

Jedan od antioksidansa koji je uključen u uklanjanje nakupljenog ROS-a u mozgu (456), bilirubin, bio je smanjen u plazmi oboljelih od AB-a i MCI-ja, dok je biliverdin, bio značajno povišen. Bilirubin, osim što štiti neurone od oksidativnog stresa, pokazuje i protuupalnu aktivnost, tako što suprimira otpuštanje proupalnih citokina, poput IL-1 β i IL-6 (457). Bilirubin se oksidira u biliverdin, koji se potom ponovno reducira natrag u bilirubin pomoću biliverdin reduktaze A, čime se održava kontinuirano antioksidativno djelovanje (458). Osim toga, bilirubin djeluje i u energetsom metabolizmu, funkciji mitohondrija i regulaciji neurotransmitera, što je ključno za stabilnost sinapsi (459). Stoga je uloga bilirubina od izuzetne važnosti, a poremećaji u njegovoj razini mogu upućivati na neuropatološke procese karakteristične za AB. Unatoč svojoj antioksidativnoj aktivnosti, različite studije navode da niske razine bilirubina doprinose

neurodegeneraciji (454,460), dok drugi ne nalaze značajnu korelaciju ili pak upućuju na povišene razine bilirubina kao kompenzacijski mehanizam (461). Ova složena uloga bilirubina, zajedno s razlikama u rezultatima između pojedinih studija, naglašava potrebu za daljnjim istraživanjima njegove uloge u patogenezi AB-a.

5.4. Usporedba metaboličkih profila ljudi i mišjeg modela AB-a

Usporedba metaboličkih profila između ljudi i animalnih modela u istraživanju AB-a omogućuje razumijevanje u kojoj mjeri eksperimentalni modeli odražavaju patološke i metaboličke promjene koje su prisutne u ljudi. Iako animalni modeli dijele relativne sličnosti u metaboličkim procesima, ipak postoje razlike u fiziologiji, genetskoj pozadini, okolišnim utjecajima i složenosti organizma koje mogu rezultirati različitim metaboličkim obrascima. AB je kompleksna i multifaktorska bolest, a zbog složene neuropatologije i simptoma, transgenični modeli teško mogu u potpunosti oponašati bolest. Međutim, trenutno su animalni modeli jedini način za istraživanje AB-a u cilju boljeg razumijevanja patoloških procesa i metaboličkih promjena na razini središnjeg živčanog sustava. Metabolomika, kao jedna od novijih *omics* pristupa, može doprinijeti boljem razumijevanju sličnosti i razlika metaboličkih puteva animalnih modela i ljudskog metabolizma. Takva saznanja mogu biti izuzetno važna za primjenu ovih modela u translacijskim istraživanjima.

Neciljana metabolomska analiza ljudske plazme detektirala je brojne aminokiseline i njihove derivate, čije su razine bile značajno snižene u skupini AB u odnosu na kontrolnu skupinu. Ovakvi rezultati su čest nalaz u metabolomskim istraživanjima, ističući da je poremećaj u metabolizmu aminokiselina jedna od ključnih značajki AB-a. U mišjem modelu AB-a identificirani su metaboliti koji su dio aminokiselinskog metabolizma, ali razine većine identificiranih aminokiselina su bile povišene u modelu AB-a. Važno je naglasiti da identificirani metaboliti mišje plazme i tkiva, nakon FDR korekcije nisu pokazali statističku značajnost unatoč $VIP > 1$, osim glicina ($p = 0,00198$, $VIP = 1,14$). Glicin i glutaminska kiselina su jedina dva metabolita koja su imala isti smjer promjene i u ljudskoj i u mišjoj plazmi, te su njihove razine bile snižene između skupine AB i kontrola. Glicin je inhibicijski neurotransmiter i zajedno s glutamatom igra važnu ulogu u ekscitatornoj neurotransmisiji kao njegov koagonist (462). Poremećaj u razinama glicina i glutamata može uzrokovati prekomjernu ekscitotoksičnost (463,464). Dodatno, glutamat igra važnu ulogu i u ciklusu TCA (327). Stoga, ovakav rezultat može sugerirati da snižene periferne razine glicina i glutamata u plazmi miševa 3xTg-AD i oboljelih od AB-a, mogli biti potencijalni pokazatelji poremećaja neurotransmisije i energetske disfunkcije.

Što se tiče metabolita ciklusa TCA, u uzorcima ljudske plazme uočen je progresivni pad sukcijske, limunske i jabučne kiseline pri prijelazu od zdravih ispitanika, preko skupine MCI do oboljelih od AB-a. U prefrontalnom korteksu miševa također su detektirana ova 3 metabolita, međutim njihove razine su bile povišene u modelu AB-a. Iako su limunska i sukcijska kiselina pokazivale trend rasta, statistička značajnost postignuta je samo za jabučnu kiselinu. Kao posljedica oksidativnog stresa, povišene razine ROS-a mogu inhibirati enzime ciklusa TCA, uzrokujući metaboličku neravnotežu i nakupljanje metabolita uključenih u ovaj ciklus (465). Biokemijske analize mozga oboljelih od AB-a pokazali su specifičnu promjenu u aktivnostima enzima ciklusa TCA te je uočeno da dolazi do smanjene aktivnosti dehidrogenaza (npr. piruvat dehidrogenaze), dok su aktivnosti nekih drugih enzima pojačane, poput malat dehidrogenaze i sukcinat dehidrogenaze (466). Nadalje, metabolomska istraživanja na uzorcima CSF-a oboljelih od AB-a pokazali su da dolazi do porasta u razinama metabolita uključenih u ciklus TCA (467). Trushina i suradnici su pokazali da su metaboliti povezani s ciklusom TCA značajno promijenjeni u CSF-u te su ove promjene povezane s progresijom AB-a (454). Ovakvi rezultati bi mogli sugerirati da postoji razlika između periferije i središnjeg živčanog sustava, pri čemu promjene u cirkulaciji ne odražavaju nužno promjene u mozgu. Povišene razine metabolita ciklusa TCA u mozgu mišjeg modela mogu predstavljati kompenzacijski mehanizam kao odgovor na oksidativni stres i mitohondrijsku disfunkciju, što je u skladu s literaturnim nalazima na ljudskim post-mortem uzorcima mozga i CSF-a.

U uvjetima smanjenog metabolizma glukoze i ciklusa TCA, organizam koristi alternativne izvore energije, među kojima su i ketonska tijela. Acetoacetat i 3-hidroksibutirat nastaju tijekom ketogeneze u jetri te se metaboliziraju u acetyl-CoA koji izravno ulazi u ciklus TCA (468). Stoga, ketonska tijela predstavljaju alternativni izvor energije u uvjetima smanjenog metabolizma glukoze, što je jedan od prvih znakova u patologiji AB-a. U našem istraživanju, u ljudskoj plazmi zabilježene su povišene razine acetoacetata u AB-u, dok su u plazmi miševa 3xTg-AD uočene povišene razine 3-hidroksibutirične kiseline (ali bez statističke značajnosti nakon stroge FDR korekcije). Međutim, ovi nalazi upućuju na pomak energetskeg metabolizma prema ketogenezi. Istraživanja su pokazala da ketonska tijela imaju pozitivan učinak na mitohondrijsku funkciju tako što povećavaju oksidaciju NADH (469,470). Također, brojna *in vivo* i *in vitro* istraživanja su pokazala antiapoptotske i antioksidativne učinke ketonskih tijela (375,471,472). Sve to upućuje da su povišene razine ovih ketonskih tijela odgovor na poremećaj energetskeg metabolizma, te prisutnost mitohondrijske disfunkcije i oksidativnog stresa.

Analizom ljudske i mišje plazme te prefrontalnog korteksa miševa pokazano je da, uz poremećaj metabolizma aminokiselina i energetskeg metabolizma, lipidni metabolizam je također narušen. Kod miševa 3xTg-AD uočene su promjene u razinama slobodnih

masnih kiselina, poput oleinske, stearinske i palmitinske kiseline, te su njihove razine bile značajno povišene u plazmi i tkivu, sugerirajući da je metabolizam masnih kiselina povezan s patogenezozom AB-a (370). Prisutnost amiloidnih plakova povezuje se s oštećenjem mitohondrija u astrocitima što dovodi do poremećaja β -oksidacije masnih kiselina (473). Ovo dovodi do lipotoksičnosti, odnosno nakupljanja masnih kiselina (473), što bi moglo objasniti njihove visoke razine u moždanom tkivu. U ljudskoj plazmi nisu detektirane ove masne kiseline, ali su uočene snižene razine oleinske kiseline u obliku lysoPC(18:0) i stearinske kiseline u obliku lysoPC(18:1). Svi detektirani glicerofosfolipidi u plazmi ispitanika s AB-om bili su značajno sniženi. Suprotno tome, u plazmi miševa 3xTg-AD detektirani glicerofosfolipidi su imali značajno povišene razine u odnosu na kontrolnu skupinu životinja, dok u moždanom tkivu nisu bili značajni ni nakon univarijatne ni multivarijatne statističke analize. Ovo upućuje na zaključak da u perifernoj cirkulaciji ljudi i miševa postoje značajne promjene u lipidnom metabolizmu kao posljedica patologiju AB-a (474), dok su ove promjene na razini mozga suptilnije. U ljudskoj i mišjoj plazmi detektirana su dva ista metabolita, lysoPC(18:1) i lysoPC(15:0), ali sa suprotnim smjerom promjene, što ukazuje na potencijalne razlike u metabolizmu lipida između vrsta, a postoji i mogućnost da su te razlike rezultat stadija bolesti.

Kolesterol predstavlja ključnu komponentu staničnih membrana središnjeg živčanog sustava te je uključen u sinaptičku plastičnost i neurotransmisiju, a povezuje se i s induciranjem tau patologije i neurodegeneracije (475). U mišjem modelu AB-a detektirane su povišene razine u plazmi i prefrontalnom korteksu u usporedbi s kontrolnim miševima, što upućuje na narušenu lipidnu homeostazu. Metabolomskom analizom na ljudskoj plazmi, nije detektiran kolesterol, ali su njegove koncentracije dodatno određene standardnim biokemijskim metodama u krvi. Analiza ukupnog kolesterola, LDL i HDL-kolesterola nije pokazala statistički značajne razlike između skupina, iako su razine ukupnog kolesterola pokazivale trend rasta kod oboljelih od AB-a u ili MCI-ja u odnosu na zdrave kontrolne ispitanike. Razine kolesterola u ljudskoj krvi ovise o brojnim čimbenicima, uključujući prehranu i životni stil, što povećava biološku varijabilnost ljudskih uzoraka u usporedbi s genetičkim animalnim modelom koji se drži u kontroliranim uvjetima. Dodatno, uočene povećane razine kolesterola kod skupine 3xTg-AD može upućivati na razlike u lipidnoj regulaciji među vrstama (476).

5.5. Učinak tretmana DHEAS na promijenjene metaboličke puteve

DHEA(S) predstavlja najzastupljenije cirkulirajuće steroidne hormone u ljudskom organizmu (174). Smatraju se neurosteroidima jer se velikim dijelom sintetiziraju *de novo* u mozgu (477). DHEA(S) ima protuupalno i antioksidativno djelovanje te modulira

neurotransmisiju, sinaptičku plastičnost i funkciju (194). Osim toga, pokazano je da DHEAS ima pozitivne učinke na kognitivne funkcije, modulaciju pamćenja, emocija i raspoloženja (478). S obzirom da su neuroupala, oksidativni stres i poremećaj u neurotransmisiji ključni događaji u AB-u, DHEAS bi potencijalno mogao imati modulacijske i neuroprotektivne učinke na navedene procese.

U ovom istraživanju miševi 3xTg-AD su tijekom 18 tjedana bili izloženi kroničnom tretmanu lijekom DHEAS kako bi se ispitali njegovi terapijski učinci. U testu ponašanja MWM mjerilo se vrijeme koje su životinje provele u zoni platforme kao mjera radne memorije. Rezultati ovog testa su pokazali da nije bilo statistički značajne razlike u vremenu između skupine koja je tretirana lijekom DHEAS i netretirane skupine 3xTg-AD, iako se može uočiti blagi trend porasta. Slično tome, rezultati Y-labirinta, koji je mjerio broj ulazaka u krakove i postotak spontanog alterniranja kao mjera lokomotorne aktivnosti, pokazali su da nije bilo statistički značajne razlike između tretirane i netretirane skupine miševa 3xTg-AD. U testu SDT također nije uočen pozitivan učinak lijeka DHEAS na vrijeme koje su životinje provele istražujući novu životinju i vrijeme koje su provele u nesocijalnom ponašanju. Ovo može sugerirati da DHEAS nije imao pozitivne učinke na kognitivne i motoričke sposobnosti miševa 3xTg-AD. Razlog tome može biti da duljina trajanja tretmana ili doza od 1mg/kg nije bila dovoljna da životinje postignu značajne promjene u ponašanju. Nadalje, u dobi od 9-10 mjeseci kod miševa 3xTg-AD poremećaji u prepoznavanju i pamćenju su jako izraženi (479). Stoga bi DHEA(S) potencijalno mogao biti učinkovit u ranijim stadijima bolesti dok još nisu nastupila prevelika kognitivna oštećenja (480). Također, potrebno je naglasiti da je u ovom istraživanju korišten najmanji potreban broj životinja u skladu s etičkim smjernicama 3R (*Replacement, reduction, refinement*), što je potencijalno moglo utjecati na postizanje značajnosti.

U ovom istraživanju naglasak je stavljen na ispitivanje učinka tretmana lijekom DHEAS na metaboličke puteve u AB-u. U plazmi i prefrontalnom korteksu miševa 3xTg-AD uočene su promjene u razinama metabolita koji su dio aminokiselinskog, energetskog i lipidnog metabolizma. Tretman lijekom DHEAS dao je pozitivne učinke na razine metabolita, poput GABA-e, piroglutamata, leucina, fenilalanina i argininsukcinatne kiseline u prefrontalnom korteksu mišjeg modela AB-a. Uspoređujući razine ovih metabolita između skupina 3xTg-AD i 3xTg-AD+DHEAS, statistički značajna razlika zabilježena je samo za GABA-u, čija je razina bila povišena u skupini tretiranoj s lijekom DHEAS. Poznato je da DHEA(S) aktivira različite receptore u plazmatskoj membrani, uključujući NMDA, receptore TRK-A, centralne receptore $\sigma 1$ i receptore GABA-A (1). Vezanjem na receptore GABA-e, DHEA(S) modulira neuronsku ekscitabilnost i tako utječe na održavanje normalnih kognitivnih funkcija (311). GABA je ključni inhibicijski neurotransmiter, a

poremećaj GABA-ergičnog sustava znatno doprinosi kognitivnoj disfunkciji, karakterističnoj u AB-u (481). Značajna smanjenja razine GABA-e vežu se uz teške stadije AB-a te se smatra da doprinose razvoju bihevioralnih i psiholoških simptoma bolesti (481). S obzirom da su u ovo istraživanje uključene životinje starosti 9-10 mjeseci moguće je da još uvijek nije došlo do potpune GABA-ergične disfunkcije, te bi porast u razinama GABA-e mogao biti kompenzacijski odgovor na patološko stanje. Nadalje, tretman DHEAS-om značajno je povećao razine GABA-e u usporedbi s kontrolnom skupinom ($\Delta = 52,8$), što sugerira na modulacijske učinke DHEAS-a i njegov potencijalni neuroprotektivni učinak u ranijim fazama bolesti. Suprotno tome, tretman neurosteroidom DHEAS nije imao značajan učinak na plazmatske razine detektiranih aminokiselina u skupini 3xTg-AD+DHEAS u usporedbi sa skupinom 3xTg-AD, osim aminokiseline alotreonin, čija zastupljenost je bila značajno snižena u skupini tretiranoj lijekom DHEAS u odnosu na kontrolnu skupinu. Ostale aminokiseline su ili bile značajne samo nakon multivarijatne statističke obrade ili nisu uopće bile značajne. Ovakav rezultat može sugerirati da DHEAS ostvaruje bolji učinak na razini središnjeg živčanog sustava djelujući preko GABA receptora.

Ravnoteža lipidnog metabolizma je znatno narušena u AB-u te se smatra da bi promjene u lipidnom metabolizmu mogle biti rani okidač za razvoj bolesti (482). U ovom istraživanju usporedbom kontrolne i skupine 3xTg-AD detektirane su značajno povišene razine masnih kiselina, poput oleinske, stearinske i linolne u plazmi i tkivu miševa. U skupini tretiranoj lijekom DHEAS postotak promjene je bio nešto niži (pad u promjeni oko 10%) u usporedbi s kontrolnom skupinom. Ovaj trend upućuje da tretman DHEAS-om može djelomično ublažiti nakupljanje masnih kiselina, ali ne dovodi do potpune normalizacije njihovih razina. Uspoređujući skupine 3xTg-AD i 3xTg-AD+DHEAS, uočen je trend smanjenja razina masnih kiselina u skupini tretiranoj DHEAS-om, pri čemu postotak promjene u razini metabolita postiže negativne vrijednosti, ali ove promjene nisu dosegle statističku značajnost nakon FDR korekcije, niti su ostvarile značajnost nakon multivarijatne statističke obrade. Odsutnost značajnosti može biti posljedica malog broja životinja po skupini. Međutim, ovakvi nalazi mogu upućivati na to da DHEAS djeluje u smjeru smanjenja razine masnih kiselina tako regulirajući lipidnu homeostazu u AB-u. Analiza razina lizofosfolipida pokazala je veliku varijabilnost i u plazmi i u tkivu među skupinama. Iako se primjećuju blagi trendovi modulacije u skupini tretiranoj DHEAS-om u odnosu na netretiranu skupinu 3xTg-AD, ti pomaci nisu statistički značajni niti dosljedni. Nadalje, uočene su i promjene u razini kolesterola u plazmi ($\Delta = 69,7$) i tkivu ($\Delta = 32,23$) miševa 3xTg-AD. Tretman lijekom DHEAS uzrokovao je blagi pad u razinama kolesterola koji je vidljiv pri usporedbi skupine 3xTg-AD+DHEAS i kontrolne skupine (u plazmi: $\Delta = 48,7$, u tkivu: $\Delta = 22,48$), gdje je statistička značajnost postignuta samo u plazmi. Usporedbom tretirane i netretirane skupine 3xTg-AD uočen je blagi pad u razinama

kolesterola, ali bez statističke značajnosti nakon FDR korekcije. Ovi rezultati upućuju na to da bi DHEAS mogao imati blagi pozitivni modulacijski učinak na razine kolesterola, osobito u plazmi. Nekoliko istraživanja pokazalo je da suplementacija DHEA(S)-om ima učinak na razine lipida, tako da smanjuje razine HDL-kolesterola (483), a povećava razine LDL-kolesterola (484), dok druga istraživanja nisu zabilježila promjene u lipidnom profilu (485). Međutim, dosad nije napravljeno nijedno metabolomsko istraživanje ispitivanja učinka DHEA(S)-a na metabolizam lipida i kolesterola. S obzirom da je lipidni metabolizam složena mreža procesa u kojem ne postoji jedan smjer djelovanja, trenutačno nije moguće donijeti zaključak o učinku DHEAS-a na regulaciju ili modulaciju lipidnog metabolizma.

5.6. Ograničenja istraživanja

Ovo istraživanje ima nekoliko ograničenja. Iako je ne ciljana metabolomska analiza provedena na dovoljno velikom broju uzoraka, nije uključivala ženski spol, niti kod ljudi niti u slučaju istraživanja na animalnom modelu. Dodatno ograničenje istraživanja predstavlja razlika u dobi, indeksu tjelesne mase i razini glukoze u krvi. Kako bi se ovi parametri isključili kao glavni uzroci razlika u zastupljenosti pojedinih metabolita između ispitivanih skupina, napravljena je korelacijska analiza. Rezultati su pokazali da je dijagnoza glavni parametar koji doprinosi razlikama među skupinama, no ne može se sa sigurnošću tvrditi da dob, indeks tjelesne mase i razina glukoze u krvi nemaju nikakav utjecaj na razine identificiranih metabolita (326). Međutim, kriteriji za određivanje statistički značajno promijenjenih metabolita između ispitivanih skupina bili su vrlo strogi, uključujući vrijednosti VIP i, u slučaju univarijatne statistike obrade podataka, Benjamini-Hochbergovu korekciju p-vrijednosti (korekcija FDR), što dobivene rezultate čini pouzdanijima.

Dio istraživanja na miševima također ima nekoliko ograničenja. U skladu s načelima 3R-a korišten je minimalan broj životinja (10 po skupini) što može ograničiti statističku snagu istraživanja i smanjiti mogućnost detekcije suptilnijih razlika između ispitivanih skupina. U ovo istraživanje su uključeni samo mužjaci miševa 3xTg-AD te bi uključivanje ženki moglo doprinijeti boljem razumijevanju patologije AB-a i učinkovitosti tretmana neurosteroidom DHEAS.

6. ZAKLJUČAK

Dobiveni rezultati ovog istraživanja potvrđuju da postoje promjene u perifernom metaboličkom profilu između osoba oboljelih od AB-a, ispitanika s MCI-jem i zdravih kontrolnih ispitanika. Promijenjeni metaboliti u AB-u pripadali su skupinama aminokiselina, hidroksi i karboksilnih kiselina, masnih acila, glicerofosfolipida i organskih spojeva. Detektirani metaboliti uključeni su u različite biološke procese, uključujući ciklus TCA, oksidativni stres, upalu, regulaciju neurotransmisije, održavanje membranskog integriteta i proizvodnju energije. Ovakvi rezultati upućuju na prisutnost poremećaja metabolizma lipida, aminokiselina i energije u AB-u, a metaboliti uključeni u ove procese bi kao periferni biomarkeri mogli imati dijagnostičku i potencijalno prognostičku vrijednost.

Neciljana metabolomska analiza pokazala je da postoje metaboličke promjene u plazmi i prefrontalnom korteksu mišjeg modela bolesti. Promijenjeni metaboliti pripadali su skupinama aminokiselina, masnih acila, glicerofosfolipida, steroidnih lipida i organskih spojeva. Promijenjen metabolički profil miševa 3xTg-AD upućuje na poremećaj u metabolizmu aminokiselina, s naglaskom na ciklus TCA, te na poremećaj u metabolizmu lipida i kolesterola. Ovakvi rezultati dovode do zaključka da genetički model AB-a pokazuje promjene u ključnim metaboličkim procesima koji su opaženi i kod ljudi, međutim, smjer promjene često nije bio identičan kao i kod ljudi, što potvrđuje i očekivanja da se metabolički profil AB-a u određenoj mjeri razlikuje između ljudi i životinja.

Dodatni zaključci:

Neciljana metabolomska analiza ljudske plazme pokazala je da su razine različitih aminokiselina, među kojima su valin, glicin, prolin, treonin i glutaminska kiselina, značajno snižene u AB-u u usporedbi sa skupinom MCI i kontrolnom skupinom. Uočeno je progresivno smanjenje razina sukcinse, jabučne i limunske kiseline od skupine zdravih ispitanika, preko MCI-ja, do skupine što upućuje na poremećaj u ciklusu TCA. Razina glukoze je bila smanjena u skupini AB u odnosu na MCI, dok su fruktoza, glukozaminska i glicerinska kiselina bile snižene kod ispitanika s dijagnozom AB-a u odnosu na MCI i zdrave kontrolne ispitanike. Razine disaharida, maltoze i izomaltoze, su bile značajno povišene u skupinama AB i MCI u usporedbi s kontrolnom skupinom. Dodatno, uočene su povišene razine acetoacetata kod ispitanika s kognitivnim oštećenjem (skupine AB i MCI) u usporedbi s kontrolnom skupinom.

U ljudskoj plazmi detektirani su metaboliti koji pripadaju skupini masnih acila, među kojima je 9-HODE, metabolit linolne kiseline, čije razina je bila značajno snižena u skupinama AB i MCI u usporedbi s zdravim kontrolnim ispitanicima. Identificirani su i metaboliti koji pripadaju skupini glicerofosfolipida, te su njihove razine bile snižene u skupinama AB i MCI u usporedbi s kontrolnom skupinom, a taj pad je vidljiv i kad se uspoređuju ispitanici s dijagnozom AB-a ili MCI-ja. PC(O-12:0/2:0), lysoPC(14:0), lysoPC(16:0) i PI(18:0/22:0) pokazuju progresivni pad zastupljenosti u plazmi od skupine zdravih kontrolnih ispitanika do AB-a. U ljudskoj plazmi detektiran je i neurosteroid DHEAS, čije su razine bile značajno snižene u skupinama AB i MCI u odnosu na kontrolu dok nije bilo značajne razlike kad su međusobno uspoređene skupine AB i MCI. Dodatno, u uzorcima plazme kod ljudi detektirani su i markeri oksidativnog stresa, među kojima su hipurna kiselina i bilirubin. Hipurna kiselina je bila povišena u plazmi ispitanika s MCI-jem u odnosu na zdrave ispitanike i osobe s AB-om te bi mogla predstavljati potencijalni biomarker za detekciju MCI-ja. Razine antioksidansa bilirubina bile su snižene kod bolesnika s AB-om u odnosu na osobe s MCI-jem. Zajedno ovakvi rezultati upućuju da je u plazmi osoba oboljelih od AB-a značajno narušen periferni metabolizam aminokiselina, ugljikohidrata i energije te lipidni metabolizam.

U mišjoj plazmi detektirana je snižena razina aminokiseline triptofan i njegovog metabolita, indolmliječne kiseline. Uočene su i snižene razine mliječne kiseline u skupini miševa 3xTg-AD u odnosu na kontrolnu skupinu. U prefrontalnom korteksu miševa detektirani su GABA, aminomalonska kiselina, asparaginska kiselina i glicin čije su razine bile povećane u skupini 3xTg-AD, unatoč tome što taj rezultat nije dostigao statističku značajnost nakon korekcije FDR. U moždanom tkivu mišjeg modela AB-a još su uočene i povišene razine limunske i jabučne kiseline. Promjene u razinama aminokiselina i njihovih metabolita te intermedijera ciklusa TCA pokazuju da u mišjem modelu bolesti također dolazi do poremećaja u navedenim metaboličkim procesima te da ove promjene mogu odražavati kompenzacijske mehanizme koji se javljaju kao odgovor na patološke procese u pozadini AB-a.

U plazmi i tkivu miševa 3xTg-AD detektirani su metaboliti koji pripadaju skupini masnih kiselina (oleinska, palmitinska, stearinska i 9-oktadekanska kiselina), različiti glicerofosfolipidi i kolesterol, čije su razine bile značajno povišene u usporedbi s kontrolnom skupinom. Promjene u razinama ovih metabolita sugeriraju da u mišjem modelu bolesti dolazi do promjena u metabolizmu masnih kiselina i glicerofosfolipida, što može biti odgovor na prisutnu patologiju u mozgu.

Usporedbom metaboličkih profila osoba oboljelih od AB-a i mišjeg modela bolesti može se zaključiti da su i kod ljudi i kod životinja narušeni ključni metabolički procesi, uključujući metabolizam aminokiselina, proizvodnja energije i lipidna homeostaza.

Glavna uočena razlika je da se smjer promjene metabolita razlikuje između miševa i ljudi, što sugerira da se regulacija metaboličkih procesa u AB-u razlikuje između ljudi i životinja. Promjene razina metabolita kod miševa 3xTg-AD mogu sugerirati na kompenzacijske ili adaptivne mehanizme koji su karakteristični za ranije stadije bolesti, dok razine metabolita u ljudskoj plazmi mogu biti pokazatelj kasnijeg stadija bolesti (s obzirom na to da su za istraživanje birani bolesnici s ozbiljnijim kognitivnim simptomima).

Izloženost lijeku DHEAS pokazuje blage modulacijske učinke na razine inhibicijskog neurotransmitera GABA u prefrontalnom korteksu. Tretman ovim neurosteroidom djelovao je na smanjenje razina masnih kiselina i u plazmi i u moždanom tkivu miševa, dok se neuroprotektivni i modulacijski učinak DHEAS-a na razine glicerofosfolipida ne može potvrditi.

7. LITERATURA

1. Strac DS, Konjevod M, Perkovic MN, Tudor L, Erjavec GN, Pivac N. Dehydroepiandrosterone (DHEA) and its Sulphate (DHEAS) in Alzheimer's Disease. *Curr Alzheimer Res.* 2020;17(2):141–57.
2. 2025 Alzheimer's disease facts and figures. Vol. 21, *Alzheimer's & Dementia.* 2025.
3. Cipriani G, Dolciotti C, Picchi L, Bonuccelli U. Alzheimer and his disease: a brief history. *Neurol Sci Off J Ital Neurol Soc Ital Soc Clin Neurophysiol.* 2011 Apr;32(2):275–9.
4. Corey-Bloom J. The ABC of Alzheimer's Disease: Cognitive Changes and Their Management in Alzheimer's Disease and Related Dementias. *Int Psychogeriatrics.* 2002;14(S1):51–75.
5. Beydoun MA, Beydoun HA, Gamaldo AA, Teel A, Zonderman AB, Wang Y. Epidemiologic studies of modifiable factors associated with cognition and dementia: systematic review and meta-analysis. *BMC Public Health.* 2014 Jun;14:643.
6. Hrvatski zavod za javno zdravstvo. Svjetski dan Alzheimerove bolesti [Internet]. 2025 [cited 2025 Oct 21]. Available from: <https://www.hzjz.hr/aktualnosti/svjetski-dan-alzheimerove-bolesti/>
7. Tönnies E, Trushina E. Oxidative Stress, Synaptic Dysfunction, and Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis.* 2017;57(4):1105–21.
8. Natalya Ortolano. No Single cell insights into an Alzheimer's disease drug target [Internet]. 2023 [cited 2025 Oct 25]. Available from: <https://www.10xgenomics.com/blog/single-cell-insights-into-an-alzheimers-disease-drug-target>
9. Kang J, Lemaire HG, Unterbeck A, Salbaum JM, Masters CL, Grzeschik KH, et al. The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature.* 1987 Feb;325(6106):733–6.
10. Rohan de Silva HA, Jen A, Wickenden C, Jen LS, Wilkinson SL, Patel AJ. Cell-specific expression of beta-amyloid precursor protein isoform mRNAs and proteins in neurons and astrocytes. *Brain Res Mol Brain Res.* 1997 Jul;47(1–2):147–56.
11. Safiri S, Ghaffari Jolfayi A, Fazlollahi A, Morsali S, Sarkesh A, Daei Sorkhabi A, et al. Alzheimer's disease: a comprehensive review of epidemiology, risk factors, symptoms diagnosis, management, caregiving, advanced treatments and associated challenges. *Front Med [Internet].* 2024;Volume 11. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/medicine/articles/10.3389/fmed.2024.1474043>

12. Coronel R, Bernabeu-Zornoza A, Palmer C, Muñiz-Moreno M, Zambrano A, Cano E, et al. Role of Amyloid Precursor Protein (APP) and Its Derivatives in the Biology and Cell Fate Specification of Neural Stem Cells. *Mol Neurobiol* [Internet]. 2018;55(9):7107–17. Available from: <https://doi.org/10.1007/s12035-018-0914-2>
13. Furukawa K, Mattson MP. Secreted amyloid precursor protein α selectively suppresses N-methyl-d-aspartate currents in hippocampal neurons: involvement of cyclic GMP. *Neuroscience* [Internet]. 1998;83(2):429–38. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0306452297003989>
14. Scheuner D, Eckman C, Jensen M, Song X, Citron M, Suzuki N, et al. Secreted amyloid β -protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease. *Nat Med* [Internet]. 1996;2(8):864–70. Available from: <https://doi.org/10.1038/nm0896-864>
15. Hardy J, Selkoe DJ. The Amyloid Hypothesis of Alzheimer's Disease: Progress and Problems on the Road to Therapeutics. *Science* (80-) [Internet]. 2002;297(5580):353–6. Available from: <https://www.science.org/doi/abs/10.1126/science.1072994>
16. Rasool S, Martinez-Coria H, Wu JW, LaFerla F, Glabe CG. Systemic vaccination with anti-oligomeric monoclonal antibodies improves cognitive function by reducing A β deposition and tau pathology in 3xTg-AD mice. *J Neurochem* [Internet]. 2013;126(4):473–82. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/jnc.12305>
17. Yang T, Li S, Xu H, Walsh DM, Selkoe DJ. Large Soluble Oligomers of Amyloid β -Protein from Alzheimer Brain Are Far Less Neuroactive Than the Smaller Oligomers to Which They Dissociate. *J Neurosci* [Internet]. 2017;37(1):152–63. Available from: <https://www.jneurosci.org/content/37/1/152>
18. Armstrong RA. The molecular biology of senile plaques and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Folia Neuropathol*. 2009;47(4):289–99.
19. Tabaton M, Piccini A. Role of water-soluble amyloid-beta in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Int J Exp Pathol*. 2005 Jun;86(3):139–45.
20. Vershinin M, Carter BC, Razafsky DS, King SJ, Gross SP. Multiple-motor based transport and its regulation by Tau. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2007;104(1):87–92. Available from: <https://www.pnas.org/doi/abs/10.1073/pnas.0607919104>
21. Jean DC, Baas PW. It cuts two ways: microtubule loss during Alzheimer disease. *EMBO J* [Internet]. 2013;32(22):2900–2. Available from: <https://www.embopress.org/doi/abs/10.1038/emboj.2013.219>
22. Fan L, Mao C, Hu X, Zhang S, Yang Z, Hu Z, et al. New Insights Into the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. *Front Neurol* [Internet]. 2020;Volume 10. Available from:

<https://www.frontiersin.org/journals/neurology/articles/10.3389/fneur.2019.01312>

23. Serý O, Povová J, Míšek I, Pešák L, Janout V. Molecular mechanisms of neuropathological changes in Alzheimer's disease: a review. *Folia Neuropathol.* 2013;51(1):1–9.
24. Gerson J, Castillo-Carranza DL, Sengupta U, Bodani R, Prough DS, DeWitt DS, et al. Tau Oligomers Derived from Traumatic Brain Injury Cause Cognitive Impairment and Accelerate Onset of Pathology in Htau Mice. *J Neurotrauma.* 2016 Nov;33(22):2034–43.
25. Gerson JE, Sengupta U, Lasagna-Reeves CA, Guerrero-Muñoz MJ, Troncoso J, Kayed R. Characterization of tau oligomeric seeds in progressive supranuclear palsy. *Acta Neuropathol Commun.* 2014 Jun;2:73.
26. Hawkins BE, Krishnamurthy S, Castillo-Carranza DL, Sengupta U, Prough DS, Jackson GR, et al. Rapid accumulation of endogenous tau oligomers in a rat model of traumatic brain injury: possible link between traumatic brain injury and sporadic tauopathies. *J Biol Chem.* 2013 Jun;288(23):17042–50.
27. Sengupta U, Guerrero-Muñoz MJ, Castillo-Carranza DL, Lasagna-Reeves CA, Gerson JE, Paulucci-Holthauzen AA, et al. Pathological interface between oligomeric alpha-synuclein and tau in synucleinopathies. *Biol Psychiatry.* 2015 Nov;78(10):672–83.
28. Bonda DJ, Castellani RJ, Zhu X, Nunomura A, Lee H, Perry G, et al. A novel perspective on tau in Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res.* 2011 Sep;8(6):639–42.
29. Cowan CM, Mudher A. Are tau aggregates toxic or protective in tauopathies? *Front Neurol.* 2013;4:114.
30. Tian H, Davidowitz E, Lopez P, Emadi S, Moe J, Sierks M. Trimeric tau is toxic to human neuronal cells at low nanomolar concentrations. *Int J Cell Biol.* 2013;2013:260787.
31. Maeda S, Sahara N, Saito Y, Murayama S, Ikai A, Takashima A. Increased levels of granular tau oligomers: an early sign of brain aging and Alzheimer's disease. *Neurosci Res.* 2006 Mar;54(3):197–201.
32. Lasagna-Reeves CA, Castillo-Carranza DL, Guerrero-Muñoz MJ, Jackson GR, Kaye R. Preparation and characterization of neurotoxic tau oligomers. *Biochemistry.* 2010 Nov;49(47):10039–41.
33. Fox LM, William CM, Adamowicz DH, Pitstick R, Carlson GA, Spires-Jones TL, et al. Soluble tau species, not neurofibrillary aggregates, disrupt neural system integration in a tau transgenic model. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2011 Jul;70(7):588–95.

34. 2024 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement*. 2024 May;20(5):3708–821.
35. Hunt A, Schönknecht P, Henze M, Seidl U, Haberkorn U, Schröder J. Reduced cerebral glucose metabolism in patients at risk for Alzheimer's disease. *Psychiatry Res Neuroimaging* [Internet]. 2007;155(2):147–54. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0925492706002289>
36. Sperling RA, Donohue MC, Raman R, Sun C-K, Yaari R, Holdridge K, et al. Association of Factors With Elevated Amyloid Burden in Clinically Normal Older Individuals. *JAMA Neurol* [Internet]. 2020;77(6):735–45. Available from: <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2020.0387>
37. Olsson B, Lautner R, Andreasson U, Öhrfelt A, Portelius E, Bjerke M, et al. CSF and blood biomarkers for the diagnosis of Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Neurol*. 2016 Jun;15(7):673–84.
38. Sperling RA, Aisen PS, Beckett LA, Bennett DA, Craft S, Fagan AM, et al. Toward defining the preclinical stages of Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimer's Dement* [Internet]. 2011;7(3):280–92. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1552526011000999>
39. McKhann GM, Knopman DS, Chertkow H, Hyman BT, Jack Jr. CR, Kawas CH, et al. The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dement* [Internet]. 2011;7(3):263–9. Available from: <https://alz-journals.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1016/j.jalz.2011.03.005>
40. Albert MS, DeKosky ST, Dickson D, Dubois B, Feldman HH, Fox NC, et al. The diagnosis of mild cognitive impairment due to Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dement* [Internet]. 2011;7(3):270–9. Available from: <https://alz-journals.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1016/j.jalz.2011.03.008>
41. Petersen RC, Lopez O, Armstrong MJ, Getchius TSD, Ganguli M, Gloss D, et al. Practice guideline update summary: Mild cognitive impairment [RETIRED]: Report of the Guideline Development, Dissemination, and Implementation Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology*. 2018 Jan;90(3):126–35.
42. Ward A, Tardiff S, Dye C, Arrighi HM. Rate of Conversion from Prodromal Alzheimer's Disease to Alzheimer's Dementia: A Systematic Review of the Literature. *Dement Geriatr Cogn Dis Extra* [Internet]. 2013 Sep 28;3(1):320–32. Available from: <https://doi.org/10.1159/000354370>

43. Vuic B, Konjevod M, Tudor L, Milos T, Nikolac Perkovic M, Nedic Erjavec G, et al. Tailoring the therapeutic interventions for behavioral and psychological symptoms of dementia. *Expert Rev Neurother*. 2022 Aug;22(8):707–20.
44. Valdez-Gaxiola CA, Rosales-Leycegui F, Gaxiola-Rubio A, Moreno-Ortiz JM, Figuera LE. Early- and Late-Onset Alzheimer's Disease: Two Sides of the Same Coin? *Dis (Basel, Switzerland)*. 2024 May;12(6).
45. Uddin MS, Hasana S, Hossain MF, Islam MS, Behl T, Perveen A, et al. Molecular Genetics of Early- and Late-Onset Alzheimer's Disease. *Curr Gene Ther* [Internet]. 2021;21(1):43–52. Available from: <https://www.benthamdirect.com/content/journals/cgt/10.2174/1566523220666201123112822>
46. Cacace R, Slegers K, Van Broeckhoven C. Molecular genetics of early-onset Alzheimer's disease revisited. *Alzheimer's Dement* [Internet]. 2016;12(6):733–48. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1552526016000790>
47. Sherrington R, Rogaev EI, Liang Y, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, et al. Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature* [Internet]. 1995;375(6534):754–60. Available from: <https://doi.org/10.1038/375754a0>
48. Levy-Lahad E, Wijsman EM, Nemens E, Anderson L, Goddard KAB, Weber JL, et al. A Familial Alzheimer's Disease Locus on Chromosome 1. *Science (80-)* [Internet]. 1995;269(5226):970–3. Available from: <https://www.science.org/doi/abs/10.1126/science.7638621>
49. Haass C, Kaether C, Thinakaran G, Sisodia S. Trafficking and proteolytic processing of APP. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012;2(5):1–26.
50. Cai Y, An SSA, Kim S. Mutations in presenilin 2 and its implications in Alzheimer's disease and other dementia-associated disorders. *Clin Interv Aging*. 2015;10:1163–72.
51. Rabinovici GD. Late-onset Alzheimer Disease. *Continuum (Minneap Minn)*. 2019 Feb;25(1):14–33.
52. Mahley RW. Apolipoprotein E: Cholesterol Transport Protein with Expanding Role in Cell Biology. *Science (80-)* [Internet]. 1988;240(4852):622–30. Available from: <https://www.science.org/doi/abs/10.1126/science.3283935>
53. Kumar A, Sidhu J, Lui F, Tsao JW. Alzheimer Disease. In *Treasure Island (FL)*; 2025.
54. Samieri C, Perier M-C, Gaye B, Proust-Lima C, Helmer C, Dartigues J-F, et al. Association of Cardiovascular Health Level in Older Age With Cognitive Decline and Incident Dementia. *JAMA*. 2018 Aug;320(7):657–64.
55. Rönnekaa E, Zethelius B, Lannfelt L, Kilander L. Vascular risk factors and

- dementia: 40-year follow-up of a population-based cohort. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 2011;31(6):460–6.
56. Abell JG, Kivimäki M, Dugravot A, Tabak AG, Fayosse A, Shipley M, et al. Association between systolic blood pressure and dementia in the Whitehall II cohort study: role of age, duration, and threshold used to define hypertension. *Eur Heart J*. 2018 Sep;39(33):3119–25.
 57. Debette S, Seshadri S, Beiser A, Au R, Himali JJ, Palumbo C, et al. Midlife vascular risk factor exposure accelerates structural brain aging and cognitive decline. *Neurology*. 2011 Aug;77(5):461–8.
 58. Johnson AL, Nystrom NC, Piper ME, Cook J, Norton DL, Zuelsdorff M, et al. Cigarette Smoking Status, Cigarette Exposure, and Duration of Abstinence Predicting Incident Dementia and Death: A Multistate Model Approach. *J Alzheimers Dis*. 2021;80(3):1013–23.
 59. Peters R, Poulter R, Warner J, Beckett N, Burch L, Bulpitt C. Smoking, dementia and cognitive decline in the elderly, a systematic review. *BMC Geriatr*. 2008 Dec;8:36.
 60. Gudala K, Bansal D, Schifano F, Bhansali A. Diabetes mellitus and risk of dementia: A meta-analysis of prospective observational studies. *J Diabetes Investig*. 2013 Nov;4(6):640–50.
 61. Vagelatos NT, Eslick GD. Type 2 Diabetes as a Risk Factor for Alzheimer’s Disease: The Confounders, Interactions, and Neuropathology Associated With This Relationship. *Epidemiol Rev* [Internet]. 2013;35(1):152–60. Available from: <https://doi.org/10.1093/epirev/mxs012>
 62. Ogino E, Manly JJ, Schupf N, Mayeux R, Gu Y. Current and past leisure time physical activity in relation to risk of Alzheimer’s disease in older adults. *Alzheimers Dement*. 2019 Dec;15(12):1603–11.
 63. Najar J, Östling S, Gudmundsson P, Sundh V, Johansson L, Kern S, et al. Cognitive and physical activity and dementia: A 44-year longitudinal population study of women. *Neurology*. 2019 Mar;92(12):e1322–30.
 64. Lourida I, Soni M, Thompson-Coon J, Purandare N, Lang IA, Ukoumunne OC, et al. Mediterranean diet, cognitive function, and dementia: a systematic review. *Epidemiology*. 2013 Jul;24(4):479–89.
 65. Stern Y. What is cognitive reserve? Theory and research application of the reserve concept. *J Int Neuropsychol Soc*. 2002 Mar;8(3):448–60.
 66. Pool LR, Weuve J, Wilson RS, Bültmann U, Evans DA, Mendes de Leon CF. Occupational cognitive requirements and late-life cognitive aging. *Neurology*. 2016 Apr;86(15):1386–92.
 67. Sando SB, Melquist S, Cannon A, Hutton M, Sletvold O, Saltvedt I, et al. Risk-

- reducing effect of education in Alzheimer's disease. *Int J Geriatr Psychiatry* [Internet]. 2008;23(11):1156–62. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/gps.2043>
68. Hendrie HC, Smith-Gamble V, Lane KA, Purnell C, Clark DO, Gao S. The Association of Early Life Factors and Declining Incidence Rates of Dementia in an Elderly Population of African Americans. *J Gerontol B Psychol Sci Soc Sci*. 2018 Apr;73(suppl_1):S82–9.
 69. Abuelezz NZ, Nasr FE, AbdulKader MA, Bassiouny AR, Zaky A. MicroRNAs as Potential Orchestrators of Alzheimer's Disease-Related Pathologies: Insights on Current Status and Future Possibilities. *Front Aging Neurosci* [Internet]. 2021;Volume 13. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/aging-neuroscience/articles/10.3389/fnagi.2021.743573>
 70. Francis PT, Palmer AM, Snape M, Wilcock GK. The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress. *J Neurol Neurosurg & Psychiatry* [Internet]. 1999;66(2):137–47. Available from: <https://jnnp.bmj.com/content/66/2/137>
 71. Hampel H, Mesulam M-M, Cuello AC, Farlow MR, Giacobini E, Grossberg GT, et al. The cholinergic system in the pathophysiology and treatment of Alzheimer's disease. *Brain*. 2018 Jul;141(7):1917–33.
 72. Hardy JA, Higgins GA. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science*. 1992 Apr;256(5054):184–5.
 73. Saito T, Iwata N, Tsubuki S, Takaki Y, Takano J, Huang S-M, et al. Somatostatin regulates brain amyloid beta peptide A β 42 through modulation of proteolytic degradation. *Nat Med*. 2005 Apr;11(4):434–9.
 74. Arya MA, Manoj Kumar MK, Sabitha M, Menon KN, Nair SC. Nanotechnology approaches for enhanced CNS delivery in treating Alzheimer's disease. *J Drug Deliv Sci Technol* [Internet]. 2019;51:297–309. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S177322471831596X>
 75. Qiang W, Yau W-M, Lu J-X, Collinge J, Tycko R. Structural variation in amyloid- β fibrils from Alzheimer's disease clinical subtypes. *Nature*. 2017 Jan;541(7636):217–21.
 76. Frost B, Jacks RL, Diamond MI. Propagation of tau misfolding from the outside to the inside of a cell. *J Biol Chem*. 2009 May;284(19):12845–52.
 77. Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Tung YC, Quinlan M, Wisniewski HM, Binder LI. Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 1986;83(13):4913–7. Available from: <https://www.pnas.org/doi/abs/10.1073/pnas.83.13.4913>
 78. Uematsu M, Nakamura A, Ebashi M, Hirokawa K, Takahashi R, Uchihara T. Brainstem tau pathology in Alzheimer's disease is characterized by increase of

- three repeat tau and independent of amyloid β . *Acta Neuropathol Commun*. 2018 Jan;6(1):1.
79. Braak H, Thal DR, Ghebremedhin E, Del Tredici K. Stages of the pathologic process in Alzheimer disease: age categories from 1 to 100 years. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2011 Nov;70(11):960–9.
 80. Sultana MA, Hia RA, Akinsiku O, Hegde V. Peripheral Mitochondrial Dysfunction: A Potential Contributor to the Development of Metabolic Disorders and Alzheimer's Disease. *Biology (Basel)*. 2023 Jul;12(7).
 81. Monzio Compagnoni G, Di Fonzo A, Corti S, Comi GP, Bresolin N, Masliah E. The Role of Mitochondria in Neurodegenerative Diseases: the Lesson from Alzheimer's Disease and Parkinson's Disease. *Mol Neurobiol*. 2020 Jul;57(7):2959–80.
 82. Wong-Guerra M, Calfio C, Maccioni RB, Rojo LE. Revisiting the neuroinflammation hypothesis in Alzheimer's disease: a focus on the druggability of current targets. *Front Pharmacol*. 2023;14:1161850.
 83. Merighi S, Nigro M, Travagli A, Gessi S. Microglia and Alzheimer's Disease. *Int J Mol Sci*. 2022 Oct;23(21).
 84. Li T, Lu L, Pember E, Li X, Zhang B, Zhu Z. New Insights into Neuroinflammation Involved in Pathogenic Mechanism of Alzheimer's Disease and Its Potential for Therapeutic Intervention. *Cells*. 2022 Jun;11(12).
 85. Obukohwo OM, Oreoluwa OA, Andrew UO, Williams UE. Microglia-mediated neuroinflammation in traumatic brain injury: a review. *Mol Biol Rep [Internet]*. 2024;51(1):1073. Available from: <https://doi.org/10.1007/s11033-024-09995-4>
 86. Bai R, Guo J, Ye X-Y, Xie Y, Xie T. Oxidative stress: The core pathogenesis and mechanism of Alzheimer's disease. *Ageing Res Rev [Internet]*. 2022;77:101619. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1568163722000617>
 87. Sultana R, Perluigi M, Butterfield DA. Lipid peroxidation triggers neurodegeneration: a redox proteomics view into the Alzheimer disease brain. *Free Radic Biol Med*. 2013 Sep;62:157–69.
 88. Kuehn B. Scientists Probe Immune System's Role in Brain Function and Neurological Disease. *JAMA*. 2008;299:619–20.
 89. Mrass P, Weninger W. Immune cell migration as a means to control immune privilege: lessons from the CNS and tumors. *Immunol Rev*. 2006 Oct;213:195–212.
 90. Popescu BO, Toescu EC, Popescu LM, Bajenaru O, Muresanu DF, Schultzberg M, et al. Blood-brain barrier alterations in ageing and dementia. *J Neurol Sci*. 2009 Aug;283(1–2):99–106.

91. Weiss N, Miller F, Cazaubon S, Couraud P-O. The blood-brain barrier in brain homeostasis and neurological diseases. *Biochim Biophys Acta*. 2009 Apr;1788(4):842–57.
92. Akiyama H, Barger S, Barnum S, Bradt B, Bauer J, Cole GM, et al. Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2000;21(3):383–421.
93. Rogers J, Lubner-Narod J, Styren SD, Civin WH. Expression of immune system-associated antigens by cells of the human central nervous system: relationship to the pathology of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 1988;9(4):339–49.
94. Wyss-Coray T. Inflammation in Alzheimer disease: driving force, bystander or beneficial response? *Nat Med*. 2006 Sep;12(9):1005–15.
95. Eikelenboom P, van Exel E, Hoozemans JJM, Veerhuis R, Rozemuller AJM, van Gool WA. Neuroinflammation - an early event in both the history and pathogenesis of Alzheimer's disease. *Neurodegener Dis*. 2010;7(1–3):38–41.
96. Hughes-Davies L, Huntsman D, Ruas M, Fuks F, Bye J, Chin SF, et al. EMSY Links the BRCA2 Pathway to Sporadic Breast and Ovarian Cancer. *Cell*. 2003;115(5):523–35.
97. McGeer EG, McGeer PL. Neuroinflammation in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment: a field in its infancy. *J Alzheimers Dis*. 2010;19(1):355–61.
98. Sokolova A, Hill MD, Rahimi F, Warden LA, Halliday GM, Shepherd CE. Monocyte chemoattractant protein-1 plays a dominant role in the chronic inflammation observed in Alzheimer's disease. *Brain Pathol*. 2009 Jul;19(3):392–8.
99. Motta M, Imbesi R, Di Rosa M, Stivala F, Malaguarnera L. Altered plasma cytokine levels in Alzheimer's disease: correlation with the disease progression. *Immunol Lett*. 2007 Nov;114(1):46–51.
100. Kotilinek LA, Westerman MA, Wang Q, Panizzon K, Lim GP, Simonyi A, et al. Cyclooxygenase-2 inhibition improves amyloid-beta-mediated suppression of memory and synaptic plasticity. *Brain*. 2008 Mar;131(Pt 3):651–64.
101. Medeiros R, Prediger RDS, Passos GF, Pandolfo P, Duarte FS, Franco JL, et al. Connecting TNF-alpha signaling pathways to iNOS expression in a mouse model of Alzheimer's disease: relevance for the behavioral and synaptic deficits induced by amyloid beta protein. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 2007 May;27(20):5394–404.
102. Arnaud L, Robakis NK, Figueiredo-Pereira ME. It may take inflammation, phosphorylation and ubiquitination to "tangle" in Alzheimer's disease. *Neurodegener Dis*. 2006;3(6):313–9.
103. Yamamoto M, Kiyota T, Horiba M, Buescher JL, Walsh SM, Gendelman HE, et al. Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha regulate amyloid-beta plaque deposition and beta-secretase expression in Swedish mutant APP transgenic

- mice. *Am J Pathol*. 2007 Feb;170(2):680–92.
104. Butterfield DA. Amyloid beta-peptide (1-42)-induced oxidative stress and neurotoxicity: implications for neurodegeneration in Alzheimer's disease brain. A review. *Free Radic Res*. 2002 Dec;36(12):1307–13.
 105. Moreira PI, Duarte AI, Santos MS, Rego AC, Oliveira CR. An integrative view of the role of oxidative stress, mitochondria and insulin in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*. 2009;16(4):741–61.
 106. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007;39(1):44–84.
 107. Brown GC, Bal-Price A. Inflammatory neurodegeneration mediated by nitric oxide, glutamate, and mitochondria. *Mol Neurobiol*. 2003 Jun;27(3):325–55.
 108. Poyton RO, Ball KA, Castello PR. Mitochondrial generation of free radicals and hypoxic signaling. *Trends Endocrinol Metab*. 2009 Sep;20(7):332–40.
 109. Sonnen JA, Breitner JC, Lovell MA, Markesbery WR, Quinn JF, Montine TJ. Free radical-mediated damage to brain in Alzheimer's disease and its transgenic mouse models. *Free Radic Biol Med*. 2008 Aug;45(3):219–30.
 110. Lovell MA, Markesbery WR. Oxidative damage in mild cognitive impairment and early Alzheimer's disease. *J Neurosci Res*. 2007 Nov;85(14):3036–40.
 111. Reed TT, Pierce WM, Markesbery WR, Butterfield DA. Proteomic identification of HNE-bound proteins in early Alzheimer disease: Insights into the role of lipid peroxidation in the progression of AD. *Brain Res*. 2009 Jun;1274:66–76.
 112. Sultana R, Butterfield DA. Oxidatively modified, mitochondria-relevant brain proteins in subjects with Alzheimer disease and mild cognitive impairment. *J Bioenerg Biomembr*. 2009 Oct;41(5):441–6.
 113. Praticò D. Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease: a reappraisal. *Trends Pharmacol Sci*. 2008 Dec;29(12):609–15.
 114. Shulman R, Rothman D, Behar K, Hyder F, Shulman RG, Rothman DL, Behar KL & Hyder F. Energetic basis of brain activity: implications for neuroimaging. *Trends Neurosci* 27: 489-495. *Trends Neurosci*. 2004;27:489–95.
 115. Boveris A, Navarro A. Brain mitochondrial dysfunction in aging. *IUBMB Life*. 2008 May;60(5):308–14.
 116. Johnson KA, Fox NC, Sperling RA, Klunk WE. Brain imaging in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012 Apr;2(4):a006213.
 117. Jeong DU, Oh JH, Lee JE, Lee J, Cho ZH, Chang JW, et al. Basal Forebrain Cholinergic Deficits Reduce Glucose Metabolism and Function of Cholinergic and GABAergic Systems in the Cingulate Cortex. *Yonsei Med J*. 2016 Jan;57(1):165–72.

118. Steen E, Terry BM, Rivera EJ, Cannon JL, Neely TR, Tavares R, et al. Impaired insulin and insulin-like growth factor expression and signaling mechanisms in Alzheimer's disease – is this type 3 diabetes? *J Alzheimer's Dis* [Internet]. 2005;7(1):63–80. Available from: <https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.3233/JAD-2005-7107>
119. González-Domínguez R, García-Barrera T, Gómez-Ariza JL. Metabolite profiling for the identification of altered metabolic pathways in Alzheimer's disease. *J Pharm Biomed Anal*. 2015 Mar;107:75–81.
120. Huo Z, Yu L, Yang J, Zhu Y, Bennett DA, Zhao J. Brain and blood metabolome for Alzheimer's dementia: findings from a targeted metabolomics analysis. *Neurobiol Aging*. 2020 Feb;86:123–33.
121. Sun L, Guo D, Jia Y, Shi M, Yang P, Wang Y, et al. Association between Human Blood Metabolome and the Risk of Alzheimer's Disease. *Ann Neurol*. 2022;92:756–67.
122. Yin F. Lipid metabolism and Alzheimer's disease: clinical evidence, mechanistic link and therapeutic promise. *FEBS J*. 2023 Mar;290(6):1420–53.
123. He X, Huang Y, Li B, Gong C-X, Schuchman EH. Deregulation of sphingolipid metabolism in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* [Internet]. 2010;31(3):398–408. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0197458008001504>
124. Li Y, Luo Y. Metabolomics of Aging and Alzheimer's Disease: From Single-Omics to Multi-Omics. 2022;
125. Wu G. Amino acids: metabolism, functions, and nutrition. *Amino Acids*. 2009 May;37(1):1–17.
126. Dalangin R, Kim A, Campbell RE. The Role of Amino Acids in Neurotransmission and Fluorescent Tools for Their Detection. *Int J Mol Sci*. 2020 Aug;21(17).
127. Francis PT, Sims NR, Procter AW, Bowen DM. Cortical Pyramidal Neurone Loss May Cause Glutamatergic Hypoactivity and Cognitive Impairment in Alzheimer's Disease: Investigative and Therapeutic Perspectives. *J Neurochem* [Internet]. 1993;60(5):1589–604. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1471-4159.1993.tb13381.x>
128. Bruno V, Battaglia G, Copani A, D'Onofrio M, Di Iorio P, De Blasi A, et al. Metabotropic Glutamate Receptor Subtypes as Targets for Neuroprotective Drugs. *J Cereb Blood Flow Metab* [Internet]. 2001 Sep 1;21(9):1013–33. Available from: <https://doi.org/10.1097/00004647-200109000-00001>
129. Gadea A, López-Colomé AM. Glial transporters for glutamate, glycine, and GABA: II. GABA transporters. *J Neurosci Res*. 2001 Mar;63(6):461–8.
130. Lin C-N, Huang C-C, Huang K-L, Lin K-J, Yen T-C, Kuo H-C. A metabolomic approach

- to identifying biomarkers in blood of Alzheimer's disease. *Ann Clin Transl Neurol* [Internet]. 2019;6(3):537–45. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/acn3.726>
131. Clark C, Dayon L, Masoodi M, Bowman GL, Popp J. An integrative multi-omics approach reveals new central nervous system pathway alterations in Alzheimer's disease. *Alzheimer's Res Ther*. 2021;13(1):1–19.
 132. Yuan Y, Zhao G, Zhao Y. Dysregulation of energy metabolism in Alzheimer's disease. *J Neurol*. 2024 Dec;272(1):2.
 133. Ambeskovic M, Hopkins G, Hoover T, Joseph JT, Montana T, Metz GAS. Metabolomic Signatures of Alzheimer's Disease Indicate Brain Region-Specific Neurodegenerative Progression. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2023;24(19). Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/24/19/14769>
 134. Cenini G, Lloret A, Cascella R. Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases: From a Mitochondrial Point of View. *Oxid Med Cell Longev*. 2019;2019:2105607.
 135. Kawade N, Yamanaka K. Novel insights into brain lipid metabolism in Alzheimer's disease: Oligodendrocytes and white matter abnormalities. *FEBS Open Bio*. 2024 Feb;14(2):194–216.
 136. Cunnane SC, Schneider JA, Tangney C, Tremblay-Mercier J, Fortier M, Bennett DA, et al. Plasma and brain fatty acid profiles in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*. 2012;29(3):691–7.
 137. Fonteh AN, Cipolla M, Chiang AJ, Edminster SP, Arakaki X, Harrington MG. Polyunsaturated Fatty Acid Composition of Cerebrospinal Fluid Fractions Shows Their Contribution to Cognitive Resilience of a Pre-symptomatic Alzheimer's Disease Cohort. *Front Physiol*. 2020;11:83.
 138. Sanchez-Mejia RO, Mucke L. Phospholipase A2 and arachidonic acid in Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta*. 2010 Aug;1801(8):784–90.
 139. Pettegrew JW, Panchalingam K, Hamilton RL, McClure RJ. Brain membrane phospholipid alterations in Alzheimer's disease. *Neurochem Res*. 2001 Jul;26(7):771–82.
 140. Igarashi M, Ma K, Gao F, Kim H-W, Rapoport SI, Rao JS. Disturbed choline plasmalogen and phospholipid fatty acid concentrations in Alzheimer's disease prefrontal cortex. *J Alzheimers Dis*. 2011;24(3):507–17.
 141. Han X, Holtzman DM, McKeel DWJ. Plasmalogen deficiency in early Alzheimer's disease subjects and in animal models: molecular characterization using electrospray ionization mass spectrometry. *J Neurochem*. 2001 May;77(4):1168–80.
 142. Burke JE, Dennis EA. Phospholipase A2 biochemistry. *Cardiovasc drugs Ther*. 2009 Feb;23(1):49–59.

143. Hicks JB, Lai Y, Sheng W, Yang X, Zhu D, Sun GY, et al. Amyloid-beta peptide induces temporal membrane biphasic changes in astrocytes through cytosolic phospholipase A2. *Biochim Biophys Acta*. 2008 Nov;1778(11):2512–9.
144. Anand A, Patience AA, Sharma N, Khurana N. The present and future of pharmacotherapy of Alzheimer's disease: A comprehensive review. *Eur J Pharmacol*. 2017 Nov;815:364–75.
145. Xu QQ, Yang W, Zhong M, Lin ZX, Gray NE, Xian YF. Animal models of alzheimer's disease: Preclinical insights and challenges. *Acta Mater Medica*. 2023;2(2):192–215.
146. Chen Z-Y, Zhang Y. Animal models of Alzheimer's disease: Applications, evaluation, and perspectives. *Zool Res*. 2022 Nov;43(6):1026–40.
147. Neha, Sodhi RK, Jaggi AS, Singh N. Animal models of dementia and cognitive dysfunction. *Life Sci*. 2014 Jul;109(2):73–86.
148. Spillantini MG, Murrell JR, Goedert M, Farlow MR, Klug A, Ghetti B. Mutation in the tau gene in familial multiple system tauopathy with presenile dementia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Jun;95(13):7737–41.
149. Hsiao K, Chapman P, Nilsen S, Eckman C, Harigaya Y, Younkin S, et al. Correlative memory deficits, Abeta elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. *Science*. 1996 Oct;274(5284):99–102.
150. Calhoun ME, Wiederhold KH, Abramowski D, Phinney AL, Probst A, Sturchler-Pierrat C, et al. Neuron loss in APP transgenic mice. Vol. 395, *Nature*. England; 1998. p. 755–6.
151. Sturchler-Pierrat C, Abramowski D, Duke M, Wiederhold KH, Mistl C, Rothacher S, et al. Two amyloid precursor protein transgenic mouse models with Alzheimer disease-like pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Nov;94(24):13287–92.
152. Dudal S, Krzykowski P, Paquette J, Morissette C, Lacombe D, Tremblay P, et al. Inflammation occurs early during the Abeta deposition process in TgCRND8 mice. *Neurobiol Aging*. 2004 Aug;25(7):861–71.
153. Krantic S, Isorce N, Mechawar N, Davoli MA, Vignault E, Albuquerque M, et al. Hippocampal GABAergic neurons are susceptible to amyloid- β toxicity in vitro and are decreased in number in the Alzheimer's disease TgCRND8 mouse model. *J Alzheimers Dis*. 2012;29(2):293–308.
154. Mucke L, Masliah E, Yu GQ, Mallory M, Rockenstein EM, Tatsuno G, et al. High-level neuronal expression of abeta 1-42 in wild-type human amyloid protein precursor transgenic mice: synaptotoxicity without plaque formation. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 2000 Jun;20(11):4050–8.
155. Yoshiyama Y, Higuchi M, Zhang B, Huang S-M, Iwata N, Saido TC, et al. Synapse loss and microglial activation precede tangles in a P301S tauopathy mouse

- model. *Neuron*. 2007 Feb;53(3):337–51.
156. Andorfer C, Kress Y, Espinoza M, de Silva R, Tucker KL, Barde Y-A, et al. Hyperphosphorylation and aggregation of tau in mice expressing normal human tau isoforms. *J Neurochem*. 2003 Aug;86(3):582–90.
 157. Santacruz K, Lewis J, Spire S, Paulson J, Kotilinek L, Ingelsson M, et al. Tau suppression in a neurodegenerative mouse model improves memory function. *Science*. 2005 Jul;309(5733):476–81.
 158. Schindowski K, Bretteville A, Leroy K, Bégard S, Brion J-P, Hamdane M, et al. Alzheimer's disease-like tau neuropathology leads to memory deficits and loss of functional synapses in a novel mutated tau transgenic mouse without any motor deficits. *Am J Pathol*. 2006 Aug;169(2):599–616.
 159. Belarbi K, Burnouf S, Fernandez-Gomez F-J, Desmercières J, Troquier L, Brouillette J, et al. Loss of medial septum cholinergic neurons in THY-Tau22 mouse model: what links with tau pathology? *Curr Alzheimer Res*. 2011 Sep;8(6):633–8.
 160. Oddo S, Caccamo A, Shepherd JD, Murphy MP, Golde TE, Kaye R, et al. Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction. *Neuron*. 2003 Jul;39(3):409–21.
 161. Billings LM, Oddo S, Green KN, McGaugh JL, LaFerla FM. Intraneuronal Abeta causes the onset of early Alzheimer's disease-related cognitive deficits in transgenic mice. *Neuron*. 2005 Mar;45(5):675–88.
 162. Caruso D, Barron AM, Brown MA, Abbiati F, Carrero P, Pike CJ, et al. Age-related changes in neuroactive steroid levels in 3xTg-AD mice. *Neurobiol Aging*. 2013 Apr;34(4):1080–9.
 163. Colović MB, Krstić DZ, Lazarević-Pašti TD, Bondžić AM, Vasić VM. Acetylcholinesterase inhibitors: pharmacology and toxicology. *Curr Neuropharmacol*. 2013 May;11(3):315–35.
 164. Rogawski MA, Wenk GL. The neuropharmacological basis for the use of memantine in the treatment of Alzheimer's disease. *CNS Drug Rev*. 2003;9(3):275–308.
 165. Kishi T, Matsunaga S, Oya K, Nomura I, Ikuta T, Iwata N. Memantine for Alzheimer's Disease: An Updated Systematic Review and Meta-analysis. *J Alzheimers Dis*. 2017;60(2):401–25.
 166. Guo J, Wang Z, Liu R, Huang Y, Zhang N, Zhang R. Memantine, Donepezil, or Combination Therapy-What is the best therapy for Alzheimer's Disease? A Network Meta-Analysis. *Brain Behav*. 2020 Nov;10(11):e01831.
 167. Vuic B, Milos T, Tudor L, Nikolac Perkovic M, Konjevod M, Nedic Erjavec G, et al. Pharmacogenomics of Dementia: Personalizing the Treatment of Cognitive and Neuropsychiatric Symptoms. *Genes (Basel)*. 2023 Nov;14(11).

168. Rehman MU, Sehar N, Dar NJ, Khan A, Arafah A, Rashid S, et al. Mitochondrial dysfunctions, oxidative stress and neuroinflammation as therapeutic targets for neurodegenerative diseases: An update on current advances and impediments. *Neurosci Biobehav Rev* [Internet]. 2023;144:104961. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S014976342200450X>
169. Song C, Shi J, Zhang P, Zhang Y, Xu J, Zhao L, et al. Immunotherapy for Alzheimer's disease: targeting β -amyloid and beyond. *Transl Neurodegener* [Internet]. 2022;11(1):18. Available from: <https://doi.org/10.1186/s40035-022-00292-3>
170. Esquer A, Blanc F, Collongues N. Immunotherapies Targeting Amyloid and Tau Protein in Alzheimer's Disease: Should We Move Away from Diseases and Focus on Biological Targets? A Systematic Review and Expert Opinion. *Neurol Ther* [Internet]. 2023;12(6):1883–907. Available from: <https://doi.org/10.1007/s40120-023-00541-1>
171. Piazza F, Winblad B. Amyloid-Related Imaging Abnormalities (ARIA) in Immunotherapy Trials for Alzheimer's Disease: Need for Prognostic Biomarkers? *J Alzheimers Dis*. 2016 Mar;52(2):417–20.
172. Verger A, Yakushev I, Albert NL, van Berckel B, Brendel M, Cecchin D, et al. FDA approval of lecanemab: the real start of widespread amyloid PET use? - the EANM Neuroimaging Committee perspective. Vol. 50, *European journal of nuclear medicine and molecular imaging*. Germany; 2023. p. 1553–5.
173. Kang C. Donanemab: First Approval. *Drugs*. 2024 Oct;84(10):1313–8.
174. Labrie F, Luu-The V, Bélanger A, Lin S-X, Simard J, Pelletier G, et al. Is dehydroepiandrosterone a hormone? *J Endocrinol*. 2005 Nov;187(2):169–96.
175. Auchus RJ. Overview of dehydroepiandrosterone biosynthesis. *Semin Reprod Med*. 2004 Nov;22(4):281–8.
176. Mueller JW, Gilligan LC, Idkowiak J, Arlt W, Foster PA. The Regulation of Steroid Action by Sulfation and Desulfation. *Endocr Rev*. 2015 Oct;36(5):526–63.
177. Yen SSC. Dehydroepiandrosterone sulfate and longevity: New clues for an old friend. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2001;98(15):8167–9. Available from: <https://www.pnas.org/doi/abs/10.1073/pnas.161278698>
178. Klinge CM, Clark BJ, Prough RA. Dehydroepiandrosterone Research: Past, Current, and Future. *Vitam Horm*. 2018;108:1–28.
179. Mellon SH, Griffin LD. Neurosteroids: biochemistry and clinical significance. *Trends Endocrinol Metab*. 2002;13(1):35–43.
180. Baulieu EE, Robel P. Dehydroepiandrosterone (DHEA) and dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) as neuroactive neurosteroids. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Apr;95(8):4089–91.
181. Webb SJ, Geoghegan TE, Prough RA, Michael Miller KK. The biological actions of

- dehydroepiandrosterone involves multiple receptors. *Drug Metab Rev.* 2006;38(1–2):89–116.
182. Prough RA, Clark BJ, Klinge CM. Novel mechanisms for DHEA action. *J Mol Endocrinol.* 2016 Apr;56(3):R139–55.
 183. Liu D, Dillon JS. Dehydroepiandrosterone activates endothelial cell nitric-oxide synthase by a specific plasma membrane receptor coupled to Galpha(i2,3). *J Biol Chem.* 2002 Jun;277(24):21379–88.
 184. Charalampopoulos I, Alexaki V-I, Lazaridis I, Dermitzaki E, Avlonitis N, Tsatsanis C, et al. G protein-associated, specific membrane binding sites mediate the neuroprotective effect of dehydroepiandrosterone. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* 2006 Mar;20(3):577–9.
 185. Chevalier M, Gilbert G, Lory P, Marthan R, Quignard JF, Savineau JP. Dehydroepiandrosterone (DHEA) inhibits voltage-gated T-type calcium channels. *Biochem Pharmacol.* 2012 Jun;83(11):1530–9.
 186. Pérez-Neri I, Montes S, Ojeda-López C, Ramírez-Bermúdez J, Ríos C. Modulation of neurotransmitter systems by dehydroepiandrosterone and dehydroepiandrosterone sulfate: mechanism of action and relevance to psychiatric disorders. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2008 Jul;32(5):1118–30.
 187. Chen CCG, Parker CRJ. Adrenal androgens and the immune system. *Semin Reprod Med.* 2004 Nov;22(4):369–77.
 188. Arquitt AB, Stoecker BJ, Hermann JS, Winterfeldt EA. Dehydroepiandrosterone sulfate, cholesterol, hemoglobin, and anthropometric measures related to growth in male adolescents. *J Am Diet Assoc.* 1991 May;91(5):575–9.
 189. Zhang L, Li B shen, Ma W, Barker JL, Chang YH, Zhao W, et al. Dehydroepiandrosterone (DHEA) and its sulfated derivative (DHEAS) regulate apoptosis during neurogenesis by triggering the Akt signaling pathway in opposing ways. *Brain Res Mol Brain Res.* 2002 Jan;98(1–2):58–66.
 190. Kurata K, Takebayashi M, Morinobu S, Yamawaki S. beta-estradiol, dehydroepiandrosterone, and dehydroepiandrosterone sulfate protect against N-methyl-D-aspartate-induced neurotoxicity in rat hippocampal neurons by different mechanisms. *J Pharmacol Exp Ther.* 2004 Oct;311(1):237–45.
 191. Mellon SH. Neurosteroid regulation of central nervous system development. *Pharmacol Ther.* 2007 Oct;116(1):107–24.
 192. Kaasik A, Kalda A, Jaako K, Zharkovsky A. Dehydroepiandrosterone sulphate prevents oxygen-glucose deprivation-induced injury in cerebellar granule cell culture. *Neuroscience.* 2001;102(2):427–32.
 193. Li H, Klein G, Sun P, Buchan AM. Dehydroepiandrosterone (DHEA) reduces

- neuronal injury in a rat model of global cerebral ischemia. *Brain Res.* 2001 Jan;888(2):263–6.
194. Iwasaki Y, Asai M, Yoshida M, Nigawara T, Kambayashi M, Nakashima N. Dehydroepiandrosterone-sulfate inhibits nuclear factor-kappaB-dependent transcription in hepatocytes, possibly through antioxidant effect. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004 Jul;89(7):3449–54.
 195. Maayan R, Touati-Werner D, Ram E, Strous R, Keren O, Weizman A. The protective effect of frontal cortex dehydroepiandrosterone in anxiety and depressive models in mice. *Pharmacol Biochem Behav.* 2006 Oct;85(2):415–21.
 196. Fedotova J, Sapronov N. Behavioral effects of dehydroepiandrosterone in adult male rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2004 Sep;28(6):1023–7.
 197. Auchus RJ, Rainey WE. Adrenarche - physiology, biochemistry and human disease. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2004 Mar;60(3):288–96.
 198. Tannenbaum C, Barrett-Connor E, Laughlin GA, Platt RW. A longitudinal study of dehydroepiandrosterone sulphate (DHEAS) change in older men and women: the Rancho Bernardo Study. *Eur J Endocrinol.* 2004 Dec;151(6):717–25.
 199. Berr C, Lafont S, Debuire B, Dartigues JF, Baulieu EE. Relationships of dehydroepiandrosterone sulfate in the elderly with functional, psychological, and mental status, and short-term mortality: a French community-based study. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Nov;93(23):13410–5.
 200. Oberbeck R, Kobbe P. Dehydroepiandrosterone (DHEA): a steroid with multiple effects. Is there any possible option in the treatment of critical illness? *Curr Med Chem.* 2010;17(11):1039–47.
 201. Schumacher M, Weill-Engerer S, Liere P, Robert F, Franklin RJM, Garcia-Segura LM, et al. Steroid hormones and neurosteroids in normal and pathological aging of the nervous system. *Prog Neurobiol.* 2003 Sep;71(1):3–29.
 202. Seely J, Amigh K, Mayhew B, Sasano H, Giguère V, Laganieri J, et al. Transcriptional Regulation of Dehydroepiandrosterone Sulfotransferase (SULT2A1) by Estrogen-Related Receptor. *Endocrinology.* 2005;146:3605–13.
 203. Sunderland T, Merrill C, Harrington M, Lawlor B, Molchan S, Martinez R, et al. REDUCED PLASMA DEHYDROEPIANDROSTERONE CONCENTRATIONS IN ALZHEIMER'S DISEASE. *Lancet [Internet].* 1989 Sep 2;334(8662):570. Available from: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(89\)90700-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(89)90700-9)
 204. Aldred S, Mecocci P. Decreased dehydroepiandrosterone (DHEA) and dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) concentrations in plasma of Alzheimer's disease (AD) patients. *Arch Gerontol Geriatr [Internet].* 2010;51(1):e16–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.archger.2009.07.001>

205. YANASE T, FUKAHORI M, TANIGUCHI S, NISHI Y, SAKAI Y, TAKAYANAGI R, et al. Serum Dehydroepiandrosterone (DHEA) and DHEA-Sulfate (DHEA-S) in Alzheimer's Disease and in Cerebrovascular Dementia. *Endocr J*. 1996;43(1):119–23.
206. Kim S-B, Hill M, Kwak Y-T, Hampl R, Jo D-H, Morfin R. Neurosteroids: Cerebrospinal Fluid Levels for Alzheimer's Disease and Vascular Dementia Diagnostics. *J Clin Endocrinol Metab* [Internet]. 2003;88(11):5199–206. Available from: <https://doi.org/10.1210/jc.2003-030646>
207. Weill-Engerer S, David J-P, Sazdovitch V, Liere P, Eychenne B, Planos A, et al. Neurosteroid quantification in human brain regions: comparison between Alzheimer's and nondemented patients. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002 Nov;87(11):5138–43.
208. Brown RC, Han Z, Cascio C, Papadopoulos V. Oxidative stress-mediated DHEA formation in Alzheimer's disease pathology. *Neurobiol Aging*. 2003;24(1):57–65.
209. Dhatriya KK, Nair KS. Dehydroepiandrosterone: is there a role for replacement? *Mayo Clin Proc*. 2003 Oct;78(10):1257–73.
210. Gandy S. Molecular basis for anti-amyloid therapy in the prevention and treatment of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2002;23(6):1009–16.
211. Danenberg HD, Haring R, Fisher A, Pittel Z, Gurwitz D, Heldman E. Dehydroepiandrosterone (DHEA) increases production and release of Alzheimer's amyloid precursor protein. *Life Sci*. 1996;59(19):1651–7.
212. Grimm A, Biliouris EE, Lang UE, Götz J, Mensah-Nyagan AG, Eckert A. Sex hormone-related neurosteroids differentially rescue bioenergetic deficits induced by amyloid- β or hyperphosphorylated tau protein. *Cell Mol Life Sci*. 2016 Jan;73(1):201–15.
213. Maninger N, Wolkowitz OM, Reus VI, Epel ES, Mellon SH. Neurobiological and neuropsychiatric effects of dehydroepiandrosterone (DHEA) and DHEA sulfate (DHEAS). *Front Neuroendocrinol*. 2009 Jan;30(1):65–91.
214. Wojtal K, Trojnar MK, Czuczwar SJ. Endogenous neuroprotective factors: neurosteroids. *Pharmacol Rep*. 2006;58(3):335–40.
215. Tamagno E, Aragno M, Boccuzzi G, Gallo M, Parola S, Fubini B, et al. Oxygen free radical scavenger properties of dehydroepiandrosterone. *Cell Biochem Funct*. 1998 Mar;16(1):57–63.
216. Jacob MHVM, Janner D da R, Belló-Klein A, Llesuy SF, Ribeiro MFM. Dehydroepiandrosterone modulates antioxidant enzymes and Akt signaling in healthy Wistar rat hearts. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2008 Nov;112(1–3):138–44.
217. Gallo M, Aragno M, Gatto V, Tamagno E, Brignardello E, Manti R, et al. Protective

- effect of dehydroepiandrosterone against lipid peroxidation in a human liver cell line. *Eur J Endocrinol*. 1999 Jul;141(1):35–9.
218. Li L, Zhao J, Ge C, Yu L, Ma H. Dehydroepiandrosterone rehabilitate BRL-3A cells oxidative stress damage induced by hydrogen peroxide. *J Cell Physiol*. 2018 Aug;233(8):6262–72.
 219. Pan X, Wu X, Kaminga AC, Wen SW, Liu A. Dehydroepiandrosterone and Dehydroepiandrosterone Sulfate in Alzheimer's Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front Aging Neurosci*. 2019;11:61.
 220. Prall SP, Muehlenbein MP. DHEA Modulates Immune Function: A Review of Evidence. *Vitam Horm*. 2018;108:125–44.
 221. Aly HF, Metwally FM, Ahmed HH. Neuroprotective effects of dehydroepiandrosterone (DHEA) in rat model of Alzheimer's disease. *Acta Biochim Pol*. 2011;58(4):513–20.
 222. Meng X, Liu Y, Xu S, Yang L, Yin R. Review on analytical technologies and applications in metabolomics. *Biocell*. 2024;48(1):65–78.
 223. Steuer A, Brockbals L, Kraemer T. Metabolomic Strategies in Biomarker Research– New Approach for Indirect Identification of Drug Consumption and Sample Manipulation in Clinical and Forensic Toxicology? *Front Chem*. 2019;7.
 224. Johnson CH, Ivanisevic J, Siuzdak G. Metabolomics: beyond biomarkers and towards mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2016 Jul;17(7):451–9.
 225. Hollywood K, Brison DR, Goodacre R. Metabolomics: current technologies and future trends. *Proteomics*. 2006 Sep;6(17):4716–23.
 226. Nedic Erjavec G, Konjevod M, Nikolac Perkovic M, Svob Strac D, Tudor L, Barbas C, et al. Short overview on metabolomic approach and redox changes in psychiatric disorders. *Redox Biol*. 2018 Apr;14:178–86.
 227. Dettmer K, Aronov PA, Hammock BD. Mass spectrometry-based metabolomics. *Mass Spectrom Rev*. 2007;26(1):51–78.
 228. Alonso A, Marsal S, Julià A. Analytical methods in untargeted metabolomics: state of the art in 2015. *Front Bioeng Biotechnol*. 2015;3:23.
 229. Dunn WB, Ellis DI. Metabolomics: Current analytical platforms and methodologies. *TrAC Trends Anal Chem [Internet]*. 2005;24(4):285–94. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165993605000348>
 230. Hajnajafi K, Iqbal MA. Mass-spectrometry based metabolomics: an overview of workflows, strategies, data analysis and applications. *Proteome Sci*. 2025 May;23(1):5.
 231. German JB, Gillies LA, Smilowitz JT, Zivkovic AM, Watkins SM. Lipidomics and lipid profiling in metabolomics. *Curr Opin Lipidol*. 2007 Feb;18(1):66–71.

232. Wolrab D, Jirásko R, Cífková E, Höring M, Mei D, Chocholoušková M, et al. Lipidomic profiling of human serum enables detection of pancreatic cancer. *Nat Commun.* 2022 Jan;13(1):124.
233. Cascante M, Marin S. Metabolomics and fluxomics approaches. *Essays Biochem.* 2008;45:67–81.
234. Salon C, Avice J-C, Colombié S, Dieuaide-Noubhani M, Gallardo K, Jeudy C, et al. Fluxomics links cellular functional analyses to whole-plant phenotyping. *J Exp Bot.* 2017 Apr;68(9):2083–98.
235. Mastrangelo A, Ferrarini A, Rey-Stolle F, García A, Barbas C. From sample treatment to biomarker discovery: A tutorial for untargeted metabolomics based on GC-(EI)-Q-MS. *Anal Chim Acta.* 2015 Nov;900:21–35.
236. Cevallos-Cevallos J, Reyes-De-Corcuera J, Etxeberria E, Danyluk M, Rodrick G. Metabolomic analysis in food science: A review. *Trends Food Sci Technol - TRENDS FOOD SCI TECHNOL.* 2009;20:557–66.
237. Gowda GAN, Zhang S, Gu H, Asiago V, Shanaiah N, Raftery D. Metabolomics-based methods for early disease diagnostics. *Expert Rev Mol Diagn.* 2008 Sep;8(5):617–33.
238. Coskun O. Separation techniques: Chromatography. *North Clin Istanbul.* 2016;3(2):156–60.
239. Cuatrecasas P, Wilchek M, Anfinsen CB. Selective enzyme purification by affinity chromatography. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1968 Oct;61(2):636–43.
240. Westman-Brinkmalm A, Silberring J, Brinkmalm G. Separation Methods. *Mass Spectrom Instrumentation, Interpret Appl.* 2008;105–15.
241. Nedic Erjavec G, Konjevod M, Nikolac Perkovic M, Svob Strac D, Tudor L, Barbas C, et al. Short overview on metabolomic approach and redox changes in psychiatric disorders. *Redox Biol* [Internet]. 2018;14(September 2017):178–86. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.redox.2017.09.002>
242. Giles Edwards P. Liquid Chromatography – Including HPLC, UHPLC and LCxLC [Internet]. 2024. Available from: <https://www.technologynetworks.com/analysis/articles/liquid-chromatography-including-hplc-uhplc-and-lcxl-344048>
243. Eiceman GA, Hill HHJ, Gardea-Torresdey J. Gas chromatography. *Anal Chem.* 2000 Jun;72(12):137R-144R.
244. Diane Turner, PhD F. Gas Chromatography – How a Gas Chromatography Machine Works, How To Read a Chromatograph and GCxGC [Internet]. 2024. Available from: <https://www.technologynetworks.com/analysis/articles/gas-chromatography-how-a-gas-chromatography-machine-works-how-to-read-a-chromatograph-and-gcxgc-335168>

245. Tagliaro F, Turrina S, Smith FP. Capillary electrophoresis: principles and applications in illicit drug analysis. *Forensic Sci Int*. 1996 Feb;77(3):211–29.
246. Wilm M. Principles of electrospray ionization. *Mol Cell Proteomics*. 2011 Jul;10(7):M111.009407.
247. Bruins AP. Mechanistic aspects of electrospray ionization. *J Chromatogr A* [Internet]. 1998;794(1):345–57. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967397011102>
248. Monge ME, Harris GA, Dwivedi P, Fernández FM. Mass spectrometry: recent advances in direct open air surface sampling/ionization. *Chem Rev*. 2013 Apr;113(4):2269–308.
249. Electrospray [Internet]. [cited 2025 Oct 25]. Available from: <https://www.matsusada.com/application/ps/electrospray/>
250. Brecht D, Uteschil F, Schmitz OJ. Development of a fast-switching dual (ESI/APCI) ionization source for liquid chromatography/mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2020 Sep;34(17):e8845.
251. Arinobu T, Hattori H, Seno H, Ishii A, Suzuki O. Comparison of SSI with APCI as an interface of HPLC-mass spectrometry for analysis of a drug and its metabolites. *J Am Soc Mass Spectrom* [Internet]. 2002;13(3):204–8. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1044030501003592>
252. Kaufmann R. Matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI) mass spectrometry: a novel analytical tool in molecular biology and biotechnology. *J Biotechnol*. 1995 Jul;41(2–3):155–75.
253. Griffiths J. A Brief History of Mass Spectrometry. *Anal Chem* [Internet]. 2008 Aug 1;80(15):5678–83. Available from: <https://doi.org/10.1021/ac8013065>
254. Gross JH. Electron Ionization BT - Mass Spectrometry: A Textbook. In: Gross JH, editor. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2004. p. 193–222. Available from: https://doi.org/10.1007/3-540-36756-X_5
255. Maciel EVS, dos Santos NG, Vargas Medina DA, Lanças FM. Electron ionization mass spectrometry: Quo vadis? *Electrophoresis* [Internet]. 2022;43(15):1587–600. Available from: <https://analyticalsciencejournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/elps.202100392>
256. Segers K, Declerck S, Mangelings D, Heyden Y Vander, Eeckhaut A Van. Analytical techniques for metabolomic studies: A review. *Bioanalysis*. 2019;11(24):2297–318.
257. Haag AM. Mass Analyzers and Mass Spectrometers. *Adv Exp Med Biol*. 2016;919:157–69.
258. Marshall DD, Powers R. Beyond the paradigm: Combining mass spectrometry and

- nuclear magnetic resonance for metabolomics. *Prog Nucl Magn Reson Spectrosc*. 2017 May;100:1–16.
259. Savaryn J, Toby T, Kelleher N. A researcher's guide to mass spectrometry-based proteomics. *Proteomics*. 2016;16.
 260. Hecht ES, Scigelova M, Eliuk S, Makarov A. Fundamentals and Advances of Orbitrap Mass Spectrometry. In: *Encyclopedia of Analytical Chemistry* [Internet]. John Wiley & Sons, Ltd; 2019. p. 1–40. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/9780470027318.a9309.pub2>
 261. Sagar Aryal P. Mass Spectrometry Explained: Principle, Steps & Uses [Internet]. 2024 [cited 2025 Oct 22]. Available from: <https://microbenotes.com/mass-spectrometry-ms-principle-working-instrumentation-steps-applications/>
 262. Ichiro H. Fundamental Guide to Liquid Chromatography Mass Spectrometry (LCMS). Shimadzu [Internet]. 2019;66. Available from: https://www.shimadzu.eu.com/sites/shimadzu.seg/files/SEG/C10G-E065A_Shimadzu_Fundamental_Guide_to_LCMS.pdf
 263. Rojo D, Barbas C, Rupérez FJ. LC-MS metabolomics of polar compounds. *Bioanalysis*. 2012 Jun;4(10):1235–43.
 264. Zhou B, Xiao JF, Tuli L, Ressom HW. LC-MS-based metabolomics. *Mol Biosyst*. 2012 Feb;8(2):470–81.
 265. Bowen BP, Northen TR. Dealing with the unknown: Metabolomics and Metabolite Atlases. *J Am Soc Mass Spectrom* [Internet]. 2010;21(9):1471–6. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jasms.2010.04.003>
 266. David A, Rostkowski P. Analytical techniques in metabolomics [Internet]. *Environmental Metabolomics: Applications in field and laboratory studies to understand from exposome to metabolome*. Elsevier Inc.; 2020. 35–64 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-818196-6.00002-9>
 267. Hopley C, Bristow T, Lubben A, Simpson A, Bull E, Klagkou K, et al. Towards a universal product ion mass spectral library – reproducibility of product ion spectra across eleven different mass spectrometers. *Rapid Commun Mass Spectrom* [Internet]. 2008;22(12):1779–86. Available from: <https://analyticalsciencejournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/rcm.3545>
 268. Milman BL. Towards a full reference library of MS_n spectra. Testing of a library containing 3126 MS₂ spectra of 1743 compounds. *Rapid Commun Mass Spectrom* [Internet]. 2005;19(19):2833–9. Available from: <https://analyticalsciencejournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/rcm.2131>
 269. Wilson ID, Nicholson JK, Castro-Perez J, Granger JH, Johnson KA, Smith BW, et al. High resolution “ultra performance” liquid chromatography coupled to oa-TOF

- mass spectrometry as a tool for differential metabolic pathway profiling in functional genomic studies. *J Proteome Res.* 2005;4(2):591–8.
270. Villas-Bôas SG, Mas S, Akesson M, Smedsgaard J, Nielsen J. Mass spectrometry in metabolome analysis. *Mass Spectrom Rev.* 2005;24(5):613–46.
 271. Beale DJ, Pinu FR, Kouremenos KA, Poojary MM, Narayana VK, Boughton BA, et al. Review of recent developments in GC-MS approaches to metabolomics-based research. *Metabolomics.* 2018 Nov;14(11):152.
 272. Gowda GAN, Djukovic D. Overview of mass spectrometry-based metabolomics: opportunities and challenges. *Methods Mol Biol.* 2014;1198:3–12.
 273. Garcia A, Barbas C. Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)-based metabolomics. *Methods Mol Biol.* 2011;708:191–204.
 274. Kopka J, Schauer N, Krueger S, Birkemeyer C, Usadel B, Bergmüller E, et al. GMD@CSB.DB: the Golm Metabolome Database. *Bioinformatics.* 2005 Apr;21(8):1635–8.
 275. Lei Z, Huhman D V, Sumner LW. Mass spectrometry strategies in metabolomics. *J Biol Chem.* 2011 Jul;286(29):25435–42.
 276. Gonzalez-Covarrubias V, Martínez-Martínez E, Del Bosque-Plata L. The Potential of Metabolomics in Biomedical Applications. *Metabolites.* 2022 Feb;12(2).
 277. Newgard CB, An J, Bain JR, Muehlbauer MJ, Stevens RD, Lien LF, et al. A branched-chain amino acid-related metabolic signature that differentiates obese and lean humans and contributes to insulin resistance. *Cell Metab.* 2009 Apr;9(4):311–26.
 278. Floegel A, Stefan N, Yu Z, Mühlenbruch K, Drogan D, Joost H-G, et al. Identification of serum metabolites associated with risk of type 2 diabetes using a targeted metabolomic approach. *Diabetes.* 2013 Feb;62(2):639–48.
 279. Floegel A, von Ruesten A, Drogan D, Schulze MB, Prehn C, Adamski J, et al. Variation of serum metabolites related to habitual diet: a targeted metabolomic approach in EPIC-Potsdam. *Eur J Clin Nutr.* 2013 Oct;67(10):1100–8.
 280. Bernini P, Bertini I, Luchinat C, Tenori L, Tognaccini A. The cardiovascular risk of healthy individuals studied by NMR metabonomics of plasma samples. *J Proteome Res.* 2011 Nov;10(11):4983–92.
 281. Mayr M, Madhu B, Xu Q. Proteomics and metabolomics combined in cardiovascular research. *Trends Cardiovasc Med.* 2007 Feb;17(2):43–8.
 282. Schmidt DR, Patel R, Kirsch DG, Lewis CA, Vander Heiden MG, Locasale JW. Metabolomics in cancer research and emerging applications in clinical oncology. *CA Cancer J Clin.* 2021 Jul;71(4):333–58.
 283. Beger RD, Dunn W, Schmidt MA, Gross SS, Kirwan JA, Cascante M, et al. Metabolomics enables precision medicine: “A White Paper, Community

- Perspective". *Metabolomics*. 2016;12(10):149.
284. Zhang Y, He C, Qiu L, Wang Y, Qin X, Liu Y, et al. Serum Unsaturated Free Fatty Acids: A Potential Biomarker Panel for Early-Stage Detection of Colorectal Cancer. *J Cancer*. 2016;7(4):477–83.
 285. Zhang Y, Song L, Liu N, He C, Li Z. Decreased serum levels of free fatty acids are associated with breast cancer. *Clin Chim Acta*. 2014 Nov;437:31–7.
 286. Bleve A, Durante B, Sica A, Consonni FM. Lipid Metabolism and Cancer Immunotherapy: Immunosuppressive Myeloid Cells at the Crossroad. *Int J Mol Sci*. 2020 Aug;21(16).
 287. Liu S, Zhong H, Zhu J, Wu L. Identification of blood metabolites associated with risk of Alzheimer's disease by integrating genomics and metabolomics data. *Mol Psychiatry* [Internet]. 2024;29(4):1153–62. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41380-023-02400-9>
 288. Orešič M, Tang J, Seppänen-Laakso T, Mattila I, Saarni SE, Saarni SI, et al. Metabolome in schizophrenia and other psychotic disorders: a general population-based study. *Genome Med*. 2011 Mar;3(3):19.
 289. Botas A, Campbell HM, Han X, Maletic-Savatic M. Chapter Two - Metabolomics of Neurodegenerative Diseases. In: Hurley MJ, editor. *Omic Studies of Neurodegenerative Disease: Part B* [Internet]. Academic Press; 2015. p. 53–80. (International Review of Neurobiology; vol. 122). Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0074774215000227>
 290. Chatterjee P, Cheong Y-J, Bhatnagar A, Goozee K, Wu Y, McKay M, et al. Plasma metabolites associated with biomarker evidence of neurodegeneration in cognitively normal older adults. *J Neurochem*. 2021 Oct;159(2):389–402.
 291. Nho K, Kueider-Paisley A, MahmoudianDehkordi S, Arnold M, Risacher SL, Louie G, et al. Altered bile acid profile in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease: Relationship to neuroimaging and CSF biomarkers. *Alzheimers Dement*. 2019 Feb;15(2):232–44.
 292. González-Domínguez R, García-Barrera T, Gómez-Ariza JL. Metabolomic study of lipids in serum for biomarker discovery in Alzheimer's disease using direct infusion mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal*. 2014 Sep;98:321–6.
 293. Gonzalez-Riano C, Saiz J, Barbas C, Bergareche A, Huerta JM, Ardanaz E, et al. Prognostic biomarkers of Parkinson's disease in the Spanish EPIC cohort: a multiplatform metabolomics approach. *NPJ Park Dis*. 2021 Aug;7(1):73.
 294. McKhann G, Drachman D, Folstein M, Katzman R, Price D, Stadlan EM. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology*. 1984 Jul;34(7):939–44.

295. Diagnostic and statistical manual of mental disorders: DSM-5™, 5th ed. Diagnostic and statistical manual of mental disorders: DSM-5™, 5th ed. Arlington, VA, US: American Psychiatric Publishing, Inc.; 2013. xlv, 947–xlv, 947.
296. Oddo S, Caccamo A, Kitazawa M, Tseng BP, LaFerla FM. Amyloid deposition precedes tangle formation in a triple transgenic model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2003 Dec;24(8):1063–70.
297. Oddo S, Caccamo A, Shepherd JD, Murphy MP, Golde TE, Kaye R, et al. Triple-transgenic model of Alzheimer's Disease with plaques and tangles: Intracellular A β and synaptic dysfunction. *Neuron*. 2003;39(3):409–21.
298. Svec F, Porter JR. The actions of exogenous dehydroepiandrosterone in experimental animals and humans. *Proc Soc Exp Biol Med Soc Exp Biol Med (New York, NY)*. 1998 Jul;218(3):174–91.
299. Vaezzadeh N. Morris Water Maze Test [Internet]. [cited 2025 Oct 29]. Available from: <https://www.biorender.com/template/morris-water-maze-test>
300. Cysneiros RM, Ribeiro FT. The endocannabinoid system: Signaling and social motivation. In: *Neurobiology and Physiology of the Endocannabinoid System*. Elsevier; 2023. p. 469–78.
301. Y Maze Test [Internet]. [cited 2025 Oct 29]. Available from: <https://www.creative-biolabs.com/drug-discovery/therapeutics/y-maze-test.htm>
302. Naz S, García A, Barbas C. Multiplatform analytical methodology for metabolic fingerprinting of lung tissue. *Anal Chem*. 2013 Nov;85(22):10941–8.
303. Kind T, Wohlgemuth G, Lee DY, Lu Y, Palazoglu M, Shahbaz S, et al. FiehnLib: mass spectral and retention index libraries for metabolomics based on quadrupole and time-of-flight gas chromatography/mass spectrometry. *Anal Chem*. 2009 Dec;81(24):10038–48.
304. Godzien J, Alonso-Herranz V, Barbas C, Armitage EG. Controlling the quality of metabolomics data: new strategies to get the best out of the QC sample. *Metabolomics* [Internet]. 2015;11(3):518–28. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s11306-014-0712-4>
305. Kuligowski J, Sánchez-Illana Á, Sanjuán-Herráez D, Vento M, Quintás G. Intra-batch effect correction in liquid chromatography-mass spectrometry using quality control samples and support vector regression (QC-SVRC). *Analyst* [Internet]. 2015;140(22):7810–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1039/C5AN01638J>
306. Chang C-C, Lin C-J. LIBSVM: A library for support vector machines. *ACM Trans Intell Syst Technol* [Internet]. 2011 May;2(3). Available from: <https://doi.org/10.1145/1961189.1961199>
307. Billoir E, Navratil V, Blaise BJ. Sample size calculation in metabolic phenotyping studies. *Brief Bioinform*. 2015;16(5):813–9.

308. Wang H, Lian K, Han B, Wang Y, Kuo S-H, Geng Y, et al. Age-related alterations in the metabolic profile in the hippocampus of the senescence-accelerated mouse prone 8: a spontaneous Alzheimer's disease mouse model. *J Alzheimers Dis.* 2014;39(4):841–8.
309. Wang G, Zhou Y, Huang F-J, Tang H-D, Xu X-H, Liu J-J, et al. Plasma metabolite profiles of Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *J Proteome Res.* 2014 May;13(5):2649–58.
310. Wang RY, Wilcox WR, Cederbaum SD. Amino Acid Metabolism. In: Reference Module in Biomedical Sciences [Internet]. Elsevier; 2014. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128012383055641>
311. Pasini E, Corsetti G, Aquilani R, Romano C, Picca A, Calvani R, et al. Protein-Amino Acid Metabolism Disarrangements: The Hidden Enemy of Chronic Age-Related Conditions. *Nutrients.* 2018;10(4).
312. Kaddurah-Daouk R, Zhu H, Sharma S, Bogdanov M, Rozen SG, Matson W, et al. Alterations in metabolic pathways and networks in Alzheimer's disease. *Transl Psychiatry.* 2013 Apr;3(4):e244.
313. Griffin JWD, Bradshaw PC. Amino Acid Catabolism in Alzheimer's Disease Brain: Friend or Foe? *Oxid Med Cell Longev.* 2017;2017:5472792.
314. Zhang N. Role of methionine on epigenetic modification of DNA methylation and gene expression in animals. *Anim Nutr (Zhongguo xu mu shou yi xue hui).* 2018 Mar;4(1):11–6.
315. Fernstrom JD. Branched-chain amino acids and brain function. *J Nutr.* 2005 Jun;135(6 Suppl):1539S–46S.
316. de Leeuw FA, Peeters CFW, Kester MI, Harms AC, Struys EA, Hankemeier T, et al. Blood-based metabolic signatures in Alzheimer's disease. *Alzheimer's Dement (Amsterdam, Netherlands).* 2017;8:196–207.
317. Van Der Velpen V, Teav T, Gallart-Ayala H, Mehl F, Konz I, Clark C, et al. Systemic and central nervous system metabolic alterations in Alzheimer's disease. *Alzheimer's Res Ther.* 2019;11(1):1–12.
318. Yilmaz A, Ugur Z, Bisgin H, Akyol S, Bahado-Singh R, Wilson G, et al. Targeted Metabolic Profiling of Urine Highlights a Potential Biomarker Panel for the Diagnosis of Alzheimer's Disease and Mild Cognitive Impairment: A Pilot Study. *Metabolites.* 2020 Aug;10(9).
319. Yu W, Chen L, Li X, Han T, Yang Y, Hu C, et al. Alteration of Metabolic Profiles during the Progression of Alzheimer's Disease. *Brain Sci.* 2023 Oct;13(10).
320. Cunnane SC, Trushina E, Morland C, Prigione A, Casadesus G, Andrews ZB, et al. Brain energy rescue: an emerging therapeutic concept for neurodegenerative disorders of ageing. *Nat Rev Drug Discov [Internet].* 2020;19(9):609–33. Available

from: <https://doi.org/10.1038/s41573-020-0072-x>

321. Yudkoff M. Interactions in the Metabolism of Glutamate and the Branched-Chain Amino Acids and Ketoacids in the CNS. *Neurochem Res*. 2017 Jan;42(1):10–8.
322. Meldrum BS. Glutamate as a Neurotransmitter in the Brain: Review of Physiology and Pathology. *J Nutr* [Internet]. 2000;130(4):1007S-1015S. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022316622140290>
323. Zhou Y, Danbolt NC. Glutamate as a neurotransmitter in the healthy brain. *J Neural Transm* [Internet]. 2014;121(8):799–817. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00702-014-1180-8>
324. Gueli MC, Taibi G. Alzheimer's disease: amino acid levels and brain metabolic status. *Neurol Sci* [Internet]. 2013;34(9):1575–9. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10072-013-1289-9>
325. Kim YH, Shim HS, Kim KH, Lee J, Chung BC, Kowall NW, et al. Metabolomic Analysis Identifies Alterations of Amino Acid Metabolome Signatures in the Postmortem Brain of Alzheimer's Disease. *Exp Neurobiol*. 2019 Jun;28(3):376–89.
326. Milos T, Rojo D, Nedic Erjavec G, Konjevod M, Tudor L, Vuic B, et al. Metabolic profiling of Alzheimer's disease: Untargeted metabolomics analysis of plasma samples. *Prog Neuro-Psychopharmacology Biol Psychiatry*. 2023;127(June):110830.
327. Schousboe A, Scafidi S, Bak LK, Waagepetersen HS, McKenna MC. Glutamate Metabolism in the Brain Focusing on Astrocytes BT - Glutamate and ATP at the Interface of Metabolism and Signaling in the Brain. In: Parpura V, Schousboe A, Verkhratsky A, editors. Cham: Springer International Publishing; 2014. p. 13–30.
328. Choi I, Son H, Baek J-H. Tricarboxylic Acid (TCA) Cycle Intermediates: Regulators of Immune Responses. *Life*. 2021;11(1).
329. Dong Y, Brewer GJ. Global Metabolic Shifts in Age and Alzheimer's Disease Mouse Brains Pivot at NAD⁺/NADH Redox Sites. *J Alzheimers Dis*. 2019;71(1):119–40.
330. Golpich M, Amini E, Mohamed Z, Azman Ali R, Mohamed Ibrahim N, Ahmadiani A. Mitochondrial Dysfunction and Biogenesis in Neurodegenerative diseases: Pathogenesis and Treatment. *CNS Neurosci Ther*. 2017 Jan;23(1):5–22.
331. Wang J, Xiong S, Xie C, Markesbery WR, Lovell MA. Increased oxidative damage in nuclear and mitochondrial DNA in Alzheimer's disease. *J Neurochem*. 2005 May;93(4):953–62.
332. Yan X, Hu Y, Wang B, Wang S, Zhang X. Metabolic Dysregulation Contributes to the Progression of Alzheimer's Disease. *Front Neurosci*. 2020;Volume 14-2020.
333. Hoffmann U, Sukhotinsky I, Eikermann-Haerter K, Ayata C. Glucose Modulation of Spreading Depression Susceptibility. *J Cereb Blood Flow & Metab*. 2013;33(2):191–5.

334. Ferrari BL, Neto G de CC, Nucci MP, Mamani JB, Lacerda SS, Felício AC, et al. The accuracy of hippocampal volumetry and glucose metabolism for the diagnosis of patients with suspected Alzheimer's disease, using automatic quantitative clinical tools. *Medicine (Baltimore)*. 2019 Nov;98(45):e17824.
335. Protas HD, Chen K, Langbaum JBS, Fleisher AS, Alexander GE, Lee W, et al. Posterior cingulate glucose metabolism, hippocampal glucose metabolism, and hippocampal volume in cognitively normal, late-middle-aged persons at 3 levels of genetic risk for Alzheimer disease. *JAMA Neurol*. 2013 Mar;70(3):320–5.
336. Simpson IA, Chundu KR, Davies-Hill T, Honer WG, Davies P. Decreased concentrations of GLUT1 and GLUT3 glucose transporters in the brains of patients with Alzheimer's disease. *Ann Neurol*. 1994;35(5):546–51.
337. Mosconi L, Pupi A, De Leon MJ. Brain Glucose Hypometabolism and Oxidative Stress in Preclinical Alzheimer's Disease. *Ann N Y Acad Sci*. 2008;1147(1):180–95.
338. Mill J, Li L. Recent Advances in Understanding of Alzheimer's Disease Progression through Mass Spectrometry-Based Metabolomics. *Phenomix (Cham, Switzerland)*. 2022 Feb;2(1):1–17.
339. Ding F, Yao J, Rettberg JR, Chen S, Brinton RD. Early Decline in Glucose Transport and Metabolism Precedes Shift to Ketogenic System in Female Aging and Alzheimer's Mouse Brain: Implication for Bioenergetic Intervention. *PLoS One*. 2013;8(11):1–14.
340. Savonije K, Weaver DF. The Role of Tryptophan Metabolism in Alzheimer's Disease. *Brain Sci*. 2023 Feb;13(2).
341. Zhuang H, Cao X, Tang X, Zou Y, Yang H, Liang Z, et al. Investigating metabolic dysregulation in serum of triple transgenic Alzheimer's disease male mice: implications for pathogenesis and potential biomarkers. *Amino Acids*. 2024 Feb;56(1):10.
342. Whiley L, Chappell KE, D'Hondt E, Lewis MR, Jiménez B, Snowden SG, et al. Metabolic phenotyping reveals a reduction in the bioavailability of serotonin and kynurenine pathway metabolites in both the urine and serum of individuals living with Alzheimer's disease. *Alzheimers Res Ther*. 2021 Jan;13(1):20.
343. Garcia-Alloza M, Gil-Bea FJ, Diez-Ariza M, Chen CPL-H, Francis PT, Lasheras B, et al. Cholinergic-serotonergic imbalance contributes to cognitive and behavioral symptoms in Alzheimer's disease. *Neuropsychologia*. 2005;43(3):442–9.
344. Metaxas A, Anzalone M, Vaitheeswaran R, Petersen S, Landau AM, Finsen B. Neuroinflammation and amyloid-beta 40 are associated with reduced serotonin transporter (SERT) activity in a transgenic model of familial Alzheimer's disease. *Alzheimers Res Ther*. 2019 May;11(1):38.
345. Willette AA, Pappas C, Hoth N, Wang Q, Klindinst B, Willette SA, et al. Inflammation, negative affect, and amyloid burden in Alzheimer's disease:

- Insights from the kynurenine pathway. *Brain Behav Immun*. 2021 Jul;95:216–25.
346. Jiang S, Srikanth M, Serpe R, Yavari S, Gaur P, Collins GA, et al. Early proteasome downregulation and dysfunction drive proteostasis failure in Alzheimer's disease. *Brain* [Internet]. 2025;148(12):4372–88. Available from: <https://doi.org/10.1093/brain/awaf222>
 347. Collins M, Friedrich C, Elcheikhali M, Stewart P, Derks J, Connors-Stewart T, et al. Ubiquitin-Proteasome System Dysregulation in Alzheimer's Disease Impacts Protein Abundance. *bioRxiv Prepr Serv Biol*. 2025 May;
 348. Salek RM, Xia J, Innes A, Sweatman BC, Adalbert R, Randle S, et al. A metabolomic study of the CRND8 transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neurochem Int*. 2010 Jul;56(8):937–47.
 349. Ross AJ, Sachdev PS. Magnetic resonance spectroscopy in cognitive research. *Brain Res Brain Res Rev*. 2004 Mar;44(2–3):83–102.
 350. Moffett JR, Ross B, Arun P, Madhavarao CN, Namboodiri AMA. N-Acetylaspartate in the CNS: from neurodiagnostics to neurobiology. *Prog Neurobiol*. 2007 Feb;81(2):89–131.
 351. Paglia G, Stocchero M, Cacciatore S, Lai S, Angel P, Alam MT, et al. Unbiased Metabolomic Investigation of Alzheimer's Disease Brain Points to Dysregulation of Mitochondrial Aspartate Metabolism. *J Proteome Res*. 2016 Feb;15(2):608–18.
 352. Dedeoglu A, Choi J-K, Cormier K, Kowall NW, Jenkins BG. Magnetic resonance spectroscopic analysis of Alzheimer's disease mouse brain that express mutant human APP shows altered neurochemical profile. *Brain Res*. 2004 Jun;1012(1–2):60–5.
 353. Garcia-Alloza M, Tsang SW, Gil-Bea FJ, Francis PT, Lai MK, Marcos B, et al. Involvement of the GABAergic system in depressive symptoms of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2006 Aug;27(8):1110–7.
 354. Andersen J V, Skotte NH, Christensen SK, Polli FS, Shabani M, Markussen KH, et al. Hippocampal disruptions of synaptic and astrocyte metabolism are primary events of early amyloid pathology in the 5xFAD mouse model of Alzheimer's disease. *Cell Death Dis*. 2021 Oct;12(11):954.
 355. Leonardi R, Jackowski S. Biosynthesis of Pantothenic Acid and Coenzyme A. *EcoSal Plus*. 2007 Apr;2(2).
 356. Scholefield M, Church SJ, Xu J, Patassini S, Hooper NM, Unwin RD, et al. Substantively Lowered Levels of Pantothenic Acid (Vitamin B5) in Several Regions of the Human Brain in Parkinson's Disease Dementia. *Metabolites*. 2021 Aug;11(9).
 357. Xu J, Patassini S, Begley P, Church S, Waldvogel HJ, Faull RLM, et al. Cerebral deficiency of vitamin B5 (d-pantothenic acid; pantothenate) as a potentially-

- reversible cause of neurodegeneration and dementia in sporadic Alzheimer's disease. *Biochem Biophys Res Commun*. 2020;527(3):676–81.
358. Harris RA, Tindale L, Lone A, Singh O, Macauley SL, Stanley M, et al. Aerobic Glycolysis in the Frontal Cortex Correlates with Memory Performance in Wild-Type Mice But Not the APP/PS1 Mouse Model of Cerebral Amyloidosis. *J Neurosci*. 2016;36(6):1871–8.
 359. Newman LA, Korol DL, Gold PE. Lactate produced by glycogenolysis in astrocytes regulates memory processing. *PLoS One*. 2011;6(12):e28427.
 360. Mosienko V, Teschemacher AG, Kasparov S. Is L-Lactate a Novel Signaling Molecule in the Brain? *J Cereb Blood Flow & Metab*. 2015;35(7):1069–75.
 361. Wang Y, Zhao J, Zhao L. L-Lactate Administration Improved Synaptic Plasticity and Cognition in Early 3xTg-AD Mice. *Int J Mol Sci*. 2025;26(4).
 362. Ansoleaga B, Jové M, Schlüter A, Garcia-Esparcia P, Moreno J, Pujol A, et al. Deregulation of purine metabolism in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2015;36(1):68–80.
 363. Xie D, Zheng Q, Lv J, Zhang Q, Cui Z, Huang S, et al. Uric Acid Functions as an Endogenous Modulator of Microglial Function and Amyloid Clearance in Alzheimer's Disease. *Adv Sci*. 2025;12(48):e10270.
 364. Doshi M, Natori Y, Ishii A, Saigusa D, Watanabe S, Hosoyamada M, et al. Hypothermia increases adenosine monophosphate and xanthosine monophosphate levels in the mouse hippocampus, preventing their reduction by global cerebral ischemia. *Sci Rep*. 2024;14(1):3187.
 365. Esteve C, Jones EA, Kell DB, Boutin H, McDonnell LA. Mass spectrometry imaging shows major derangements in neurogranin and in purine metabolism in the triple-knockout 3xTg Alzheimer mouse model. *Biochim Biophys acta Proteins proteomics*. 2017 Jul;1865(7):747–54.
 366. Naudí A, Cabré R, Jové M, Ayala V, Gonzalo H, Portero-Otín M, et al. Lipidomics of human brain aging and Alzheimer's disease pathology. *Int Rev Neurobiol*. 2015;122:133–89.
 367. Chrast R, Saher G, Nave K-A, Verheijen MHG. Lipid metabolism in myelinating glial cells: lessons from human inherited disorders and mouse models. *J Lipid Res*. 2011 Mar;52(3):419–34.
 368. Wang X, Zhu M, Hjorth E, Cortés-Toro V, Eyjolfsson H, Graff C, et al. Resolution of inflammation is altered in Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*. 2015 Jan;11(1):40–2.
 369. Bhattacharyya R, Black SE, Lotlikar MS, Fenn RH, Jorfi M, Kovacs DM, et al. Axonal generation of amyloid- β from palmitoylated APP in mitochondria-associated endoplasmic reticulum membranes. *Cell Rep*. 2021 May;35(7):109134.

370. Ju Y, Li S, Kong X, Zhao Q. Exploring fatty acid metabolism in Alzheimer ' s disease : the key role of. 2024;1–18.
371. Graber R, Sumida C, Nunez EA. Fatty acids and cell signal transduction. *J Lipid Mediat Cell Signal*. 1994 Mar;9(2):91–116.
372. Ooi K-LM, Vacy K, Boon WC. Fatty acids and beyond: Age and Alzheimer's disease related changes in lipids reveal the neuro-nutraceutical potential of lipids in cognition. *Neurochem Int*. 2021 Oct;149:105143.
373. Snowden SG, Ebshiana AA, Hye A, An Y, Pletnikova O, O'Brien R, et al. Association between fatty acid metabolism in the brain and Alzheimer disease neuropathology and cognitive performance: A nontargeted metabolomic study. *PLoS Med*. 2017 Mar;14(3):e1002266.
374. Fraser T, Tayler H, Love S. Fatty Acid Composition of Frontal, Temporal and Parietal Neocortex in the Normal Human Brain and in Alzheimer's Disease. *Neurochem Res* [Internet]. 2010;35(3):503–13. Available from: <https://doi.org/10.1007/s11064-009-0087-5>
375. Kim DY, Davis LM, Sullivan PG, Maalouf M, Simeone TA, Brederode J van, et al. Ketone bodies are protective against oxidative stress in neocortical neurons. *J Neurochem* [Internet]. 2007;101(5):1316–26. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1471-4159.2007.04483.x>
376. Wood PL, Medicherla S, Sheikh N, Terry B, Phillipps A, Kaye JA, et al. Targeted Lipidomics of Frontal Cortex and Plasma Diacylglycerols (DAG) in Mild Cognitive Impairment and Alzheimer's Disease: Validation of DAG Accumulation Early in the Pathophysiology of Alzheimer's Disease. *J Alzheimer's Dis*. 2015;48:537–46.
377. Chan RB, Oliveira TG, Cortes EP, Honig LS, Duff KE, Small SA, et al. Comparative lipidomic analysis of mouse and human brain with Alzheimer disease. *J Biol Chem*. 2012 Jan;287(4):2678–88.
378. Proitsi P, Kim M, Whitley L, Simmons A, Sattlecker M, Velayudhan L, et al. Association of blood lipids with Alzheimer's disease: A comprehensive lipidomics analysis. *Alzheimers Dement*. 2017 Feb;13(2):140–51.
379. Wood PL, Barnette BL, Kaye JA, Quinn JF, Woltjer RL. Non-targeted lipidomics of CSF and frontal cortex grey and white matter in control, mild cognitive impairment, and Alzheimer's disease subjects. *Acta Neuropsychiatr*. 2015 Oct;27(5):270–8.
380. Kalecký K, German DC, Montillo AA, Bottiglieri T. Targeted Metabolomic Analysis in Alzheimer's Disease Plasma and Brain Tissue in Non-Hispanic Whites. *J Alzheimers Dis*. 2022;86(4):1875–95.
381. Genedani S, Rasio G, Cortelli P, Antonelli F, Guidolin D, Galantucci M, et al. Studies on homocysteine and dehydroepiandrosterone sulphate plasma levels in

- Alzheimer's disease patients and in Parkinson's disease patients. *Neurotox Res.* 2004;6(4):327–32.
382. Aldred S, Mecocci P. Decreased dehydroepiandrosterone (DHEA) and dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) concentrations in plasma of Alzheimer's disease (AD) patients. *Arch Gerontol Geriatr.* 2010;51(1):e16–8.
 383. Marx CE, Trost WT, Shampine LJ, Stevens RD, Hulette CM, Steffens DC, et al. The neurosteroid allopregnanolone is reduced in prefrontal cortex in Alzheimer's disease. *Biol Psychiatry.* 2006 Dec;60(12):1287–94.
 384. Desale SE, Chinnathambi S. Role of dietary fatty acids in microglial polarization in Alzheimer's disease. *J Neuroinflammation* [Internet]. 2020;17(1):93. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12974-020-01742-3>
 385. Patil S, Chan C. Palmitic and stearic fatty acids induce Alzheimer-like hyperphosphorylation of tau in primary rat cortical neurons. *Neurosci Lett.* 2005 Aug;384(3):288–93.
 386. Wilson DM, Binder LI. Free fatty acids stimulate the polymerization of tau and amyloid beta peptides. In vitro evidence for a common effector of pathogenesis in Alzheimer's disease. *Am J Pathol.* 1997 Jun;150(6):2181–95.
 387. Amtul Z, Westaway D, Cechetto DF, Rozmahel RF. Oleic acid ameliorates amyloidosis in cellular and mouse models of Alzheimer's disease. *Brain Pathol.* 2011 May;21(3):321–9.
 388. Dakterzada F, Jové M, Cantero JL, Mota-Martorell N, Pamplona R, Piñoll-Ripoll G. The shift in the fatty acid composition of the circulating lipidome in Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dement.* 2024;20(5):3322–33.
 389. Martínez-Lapiscina EH, Clavero P, Toledo E, San Julián B, Sanchez-Tainta A, Corella D, et al. Virgin olive oil supplementation and long-term cognition: the PREDIMED-NAVARRA randomized, trial. *J Nutr Health Aging.* 2013;17(6):544–52.
 390. Beaulieu J, Costa G, Renaud J, Moitié A, Glémet H, Sergi D, et al. The Neuroinflammatory and Neurotoxic Potential of Palmitic Acid Is Mitigated by Oleic Acid in Microglial Cells and Microglial-Neuronal Co-cultures. *Mol Neurobiol.* 2021 Jun;58(6):3000–14.
 391. Kwon B, Lee H-K, Querfurth HW. Oleate prevents palmitate-induced mitochondrial dysfunction, insulin resistance and inflammatory signaling in neuronal cells. *Biochim Biophys Acta.* 2014 Jul;1843(7):1402–13.
 392. Ferré-González L, Balaguer Á, Roca M, Ftara A, Lloret A, Cháfer-Pericás C. Plasma lipidomics in early APP/PS1 female mouse model and its relationship with brain: Is it affected by the estrous cycle? *Alzheimers Res Ther.* 2024;16(1):183.
 393. Brejchova K, Balas L, Paluchova V, Brezinova M, Durand T, Kuda O. Understanding FAHFs: From structure to metabolic regulation. *Prog Lipid Res.* 2020

Jul;79:101053.

394. Farida Dakterzada Raquel Huerto, Anna Carnes, Joaquim Sol, Reinald Pamplona, Gerard Piñol-Ripoll MJ. Changes in Plasma Neutral and Ether-Linked Lipids Are Associated with The Pathology and Progression of Alzheimer’s Disease. Vol. 14, Aging and disease. p. 1728–38.
395. Jones LL, McDonald DA, Borum PR. Acylcarnitines: Role in brain. *Prog Lipid Res.* 2010;49(1):61–75.
396. Huo Z, Yu L, Yang J, Zhu Y, Bennett DA, Zhao J. Corrigendum to brain and blood metabolome for Alzheimer’s dementia: findings from a targeted metabolomics analysis [Neurobiology of Aging Volume 86, February 2020, Pages 123-133]. *Neurobiol Aging.* 2020;91:169.
397. Ciavardelli D, Piras F, Consalvo A, Rossi C, Zucchelli M, Di Ilio C, et al. Medium-chain plasma acylcarnitines, ketone levels, cognition, and gray matter volumes in healthy elderly, mildly cognitively impaired, or Alzheimer’s disease subjects. *Neurobiol Aging.* 2016;43:1–12.
398. Cristofano A, Sapere N, La Marca G, Angiolillo A, Vitale M, Corbi G, et al. Serum Levels of Acyl-Carnitines along the Continuum from Normal to Alzheimer’s Dementia. *PLoS One.* 2016;11(5):1–16.
399. Feringa FM, van der Kant R. Cholesterol and Alzheimer’s Disease; From Risk Genes to Pathological Effects. *Front Aging Neurosci.* 2021;13:690372.
400. Ahmed H, Wang Y, Griffiths WJ, Levey AI, Pikuleva I, Liang SH, et al. Brain cholesterol and Alzheimer’s disease: challenges and opportunities in probe and drug development. *Brain.* 2024 May;147(5):1622–35.
401. Barrett PJ, Song Y, Van Horn WD, Hustedt EJ, Schafer JM, Hadziselimovic A, et al. The amyloid precursor protein has a flexible transmembrane domain and binds cholesterol. *Science.* 2012 Jun;336(6085):1168–71.
402. Habchi J, Chia S, Galvagnion C, Michaels TCT, Bellaiche MMJ, Ruggeri FS, et al. Cholesterol catalyses A β 42 aggregation through a heterogeneous nucleation pathway in the presence of lipid membranes. *Nat Chem.* 2018 Jun;10(6):673–83.
403. Wang H, Kulas JA, Wang C, Holtzman DM, Ferris HA, Hansen SB. Regulation of beta-amyloid production in neurons by astrocyte-derived cholesterol. *Proc Natl Acad Sci.* 2021;118(33):e2102191118.
404. Cutler RG, Kelly J, Storie K, Pedersen WA, Tammara A, Hatanpaa K, et al. Involvement of oxidative stress-induced abnormalities in ceramide and cholesterol metabolism in brain aging and Alzheimer’s disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Feb;101(7):2070–5.
405. Popp J, Meichsner S, Kölsch H, Lewczuk P, Maier W, Kornhuber J, et al. Cerebral and extracerebral cholesterol metabolism and CSF markers of Alzheimer’s

- disease. *Biochem Pharmacol*. 2013 Jul;86(1):37–42.
406. Liu Y, Zhong X, Shen J, Jiao L, Tong J, Zhao W, et al. Elevated serum TC and LDL-C levels in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment: A meta-analysis study. *Brain Res*. 2020 Jan;1727:146554.
 407. Hascalovici JR, Song W, Liberman A, Vaya J, Khatib S, Holcroft C, et al. Neural HO-1/sterol interactions in vivo: implications for Alzheimer's disease. *Neuroscience*. 2014 Nov;280:40–9.
 408. Varma VR, Büşra Lülecı H, Oommen AM, Varma S, Blackshear CT, Griswold ME, et al. Abnormal brain cholesterol homeostasis in Alzheimer's disease-a targeted metabolomic and transcriptomic study. *NPJ aging Mech Dis*. 2021 Jun;7(1):11.
 409. Farooqui AA, Horrocks LA, Farooqui T. Glycerophospholipids in brain: their metabolism, incorporation into membranes, functions, and involvement in neurological disorders. *Chem Phys Lipids*. 2000 Jun;106(1):1–29.
 410. Farooqui AA. Lipid mediators in the neural cell nucleus: their metabolism, signaling, and association with neurological disorders. *Neurosci a Rev J bringing Neurobiol Neurol psychiatry*. 2009 Aug;15(4):392–407.
 411. Fiandaca MS, Zhong X, Cheema AK, Orquiza MH, Chidambaram S, Tan MT, et al. Plasma 24-metabolite Panel Predicts Preclinical Transition to Clinical Stages of Alzheimer's Disease. *Front Neurol*. 2015;6:237.
 412. Costa AC, Joaquim HPG, Forlenza O, Talib LL, Gattaz WF. Plasma lipids metabolism in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *world J Biol psychiatry Off J World Fed Soc Biol Psychiatry*. 2019 Mar;20(3):190–6.
 413. Nitsch RM, Blusztajn JK, Pittas AG, Slack BE, Growdon JH, Wurtman RJ. Evidence for a membrane defect in Alzheimer disease brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992 Mar;89(5):1671–5.
 414. Whiley L, Sen A, Heaton J, Proitsi P, García-Gómez D, Leung R, et al. Evidence of altered phosphatidylcholine metabolism in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2014 Feb;35(2):271–8.
 415. Simpson BN, Kim M, Chuang Y-F, Beason-Held L, Kitner-Triolo M, Kraut M, et al. Blood metabolite markers of cognitive performance and brain function in aging. *J Cereb blood flow Metab Off J Int Soc Cereb Blood Flow Metab*. 2016 Jul;36(7):1212–23.
 416. Li H, Zhao Z, Zhu L, Tan Y, Zhang Z, Zhang Z, et al. Spatial-temporal lipidomics reveals dysregulated lipid metabolism in mouse brain during Alzheimer's disease progression. *J Adv Res [Internet]*. 2025; Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2090123225006599>
 417. Hussain G, Anwar H, Rasul A, Imran A, Qasim M, Zafar S, et al. Lipids as biomarkers of brain disorders. *Crit Rev Food Sci Nutr [Internet]*. 2020;60(3):351 – 374.

Available from: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85073549110&doi=10.1080%2F10408398.2018.1529653&partnerID=40&md5=b78e7fb805035f2ecb1cbea67246b5bd>

418. Gattaz WF, Förstl H, Braus DF, Maras A, Cairns NJ, Levy R. Decreased phospholipase A2 activity in the brain and in platelets of patients with Alzheimer's disease. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*. 1996;246(3):129–31.
419. Li N, Liu W, Li W, Li S, Chen X, Bi K, et al. Plasma metabolic profiling of Alzheimer's disease by liquid chromatography/mass spectrometry. *Clin Biochem*. 2010 Aug;43(12):992–7.
420. González-Domínguez R, García-Barrera T, Gómez-Ariza JL. Combination of metabolomic and phospholipid-profiling approaches for the study of Alzheimer's disease. *J Proteomics*. 2014 Jun;104:37–47.
421. Tamanna N, Mahmood N. Emerging Roles of Branched-Chain Amino Acid Supplementation in Human Diseases. *Int Sch Res Not*. 2014;2014:235619.
422. Mulder C, Wahlund L-O, Teerlink T, Blomberg M, Veerhuis R, van Kamp GJ, et al. Decreased lysophosphatidylcholine/phosphatidylcholine ratio in cerebrospinal fluid in Alzheimer's disease. *J Neural Transm*. 2003 Aug;110(8):949–55.
423. Grimm MOW, Grösgen S, Riemenschneider M, Tanila H, Grimm HS, Hartmann T. From brain to food: analysis of phosphatidylcholins, lyso-phosphatidylcholins and phosphatidylcholin-plasmalogens derivatives in Alzheimer's disease human post mortem brains and mice model via mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2011 Oct;1218(42):7713–22.
424. Blasko I, Defrancesco M, Oberacher H, Loacker L, Kemmler G, Marksteiner J, et al. Plasma phosphatidylcholines and vitamin B12/folate levels are possible prognostic biomarkers for progression of Alzheimer's disease. *Exp Gerontol*. 2021 May;147:111264.
425. Toncan F, Raj RR, Lee M-J. Dynamics of Fatty Acid Composition in Lipids and Their Distinct Roles in Cardiometabolic Health. *Biomolecules*. 2025 May;15(5).
426. Migliore L, Fontana I, Colognato R, Coppede F, Siciliano G, Murri L. Searching for the role and the most suitable biomarkers of oxidative stress in Alzheimer's disease and in other neurodegenerative diseases. *Neurobiol Aging*. 2005;26(5):587–95.
427. Christen Y. Oxidative stress and Alzheimer disease¹². *Am J Clin Nutr*. 2000;71(2):621S-629S.
428. Kurano M, Saito Y, Uranbileg B, Saigusa D, Kano K, Aoki J, et al. Modulations of bioactive lipids and their receptors in postmortem Alzheimer's disease brains. *Front Aging Neurosci*. 2022;Volume 14-2022.
429. González-Domínguez R, García-Barrera T, Vitorica J, Gómez-Ariza JL. Region-

- specific metabolic alterations in the brain of the APP/PS1 transgenic mice of Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis* [Internet]. 2014;1842(12, Part A):2395–402. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0925443914003032>
430. Zhang X, Liu W, Zan J, Wu C, Tan W. Untargeted lipidomics reveals progression of early Alzheimer's disease in APP/PS1 transgenic mice. *Sci Rep* [Internet]. 2020;10(1):14509. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-71510-z>
 431. Ojo JO, Algamal M, Leary P, Abdullah L, Mouzon B, Evans JE, et al. Converging and Differential Brain Phospholipid Dysregulation in the Pathogenesis of Repetitive Mild Traumatic Brain Injury and Alzheimer's Disease. *Front Neurosci*. 2019;13:103.
 432. Crivelli SM, van Kruining D, Luo Q, Stevens JAA, Giovagnoni C, Paulus A, et al. Ceramide analog [(18)F]F-HPA-12 detects sphingolipid disbalance in the brain of Alzheimer's disease transgenic mice by functioning as a metabolic probe. *Sci Rep*. 2020 Nov;10(1):19354.
 433. Granger MW, Liu H, Fowler CF, Blanchard AP, Taylor MW, Sherman SPM, et al. Distinct disruptions in Land's cycle remodeling of glycerophosphocholines in murine cortex mark symptomatic onset and progression in two Alzheimer's disease mouse models. *J Neurochem*. 2019 May;149(4):499–517.
 434. Gonzalez-Riano C, Garcia A, Barbas C. Metabolomics studies in brain tissue: A review. *J Pharm Biomed Anal*. 2016 Oct;130:141–68.
 435. Zhang X, Liu W, Cao Y, Tan W. Hippocampus Proteomics and Brain Lipidomics Reveal Network Dysfunction and Lipid Molecular Abnormalities in APP/PS1 Mouse Model of Alzheimer's Disease. *J Proteome Res* [Internet]. 2020 Aug 7;19(8):3427–37. Available from: <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.0c00255>
 436. Dinkins MB, Enasko J, Hernandez C, Wang G, Kong J, Helwa I, et al. Neutral Sphingomyelinase-2 Deficiency Ameliorates Alzheimer's Disease Pathology and Improves Cognition in the 5XFAD Mouse. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 2016 Aug;36(33):8653–67.
 437. Michno W, Kaya I, Nyström S, Guerard L, Nilsson KPR, Hammarström P, et al. Multimodal Chemical Imaging of Amyloid Plaque Polymorphism Reveals A β Aggregation Dependent Anionic Lipid Accumulations and Metabolism. *Anal Chem*. 2018 Jul;90(13):8130–8.
 438. Hossen F, Hung J, Odeh H, Sun GY, Lee JC. Cytosolic phospholipase A2 links tau pathology to insulin signaling impairment in Alzheimer's disease. *Front Aging Neurosci*. 2025;Volume 17.
 439. Leslie CC. Cytosolic phospholipase A₂: physiological function and role in disease. *J Lipid Res*. 2015 Aug;56(8):1386–402.

440. Sun GY, Shelat PB, Jensen MB, He Y, Sun AY, Simonyi A. Phospholipases A2 and inflammatory responses in the central nervous system. *Neuromolecular Med.* 2010 Jun;12(2):133–48.
441. Lin D, Gold A, Kaye S, Atkinson JR, Tol M, Sas A, et al. Arachidonic Acid Mobilization and Peroxidation Promote Microglial Dysfunction in A β Pathology. *J Neurosci.* 2024;44(31).
442. Wang B, Tontonoz P. Phospholipid Remodeling in Physiology and Disease. *Annu Rev Physiol.* 2019 Feb;81:165–88.
443. Tajima Y, Ishikawa M, Maekawa K, Murayama M, Senoo Y, Nishimaki-Mogami T, et al. Lipidomic analysis of brain tissues and plasma in a mouse model expressing mutated human amyloid precursor protein/tau for Alzheimer's disease. *Lipids Health Dis.* 2013;12(1):68.
444. Semba RD. Perspective: The Potential Role of Circulating Lysophosphatidylcholine in Neuroprotection against Alzheimer Disease. *Adv Nutr.* 2020;11(4):760–72.
445. Casas-Fernández E, Peña-Bautista C, Baquero M, fer-Pericás C. Lipids as Early and Minimally Invasive Biomarkers for Alzheimer's Disease. *Curr Neuropharmacol.* 2022;20(8):1613–31.
446. Peña-Bautista C, Álvarez-Sánchez L, Roca M, García-Vallés L, Baquero M, Cháfer-Pericás C. Plasma Lipidomics Approach in Early and Specific Alzheimer's Disease Diagnosis. *J Clin Med.* 2022;11(17).
447. Houldsworth A. Role of oxidative stress in neurodegenerative disorders: a review of reactive oxygen species and prevention by antioxidants. *Brain Commun* [Internet]. 2024;6(1):fcad356. Available from: <https://doi.org/10.1093/braincomms/fcad356>
448. Uddin MS, Kabir MT. Oxidative Stress in Alzheimer's Disease: Molecular Hallmarks of Underlying Vulnerability. In: Ashraf GM, Alexiou A, editors. *Biological, Diagnostic and Therapeutic Advances in Alzheimer's Disease: Non-Pharmacological Therapies for Alzheimer's Disease.* Singapore: Springer Singapore; 2019. p. 91–115.
449. Palau-Rodríguez M, Tulipani S, Isabel Queipo-Ortuño M, Urpi-Sarda M, Tinahones FJ, Andres-Lacueva C. Metabolomic insights into the intricate gut microbial-host interaction in the development of obesity and type 2 diabetes. *Front Microbiol.* 2015;6:1151.
450. Sun B, Wang X, Liu X, Wang L, Ren F, Wang X, et al. Hippuric Acid Promotes Renal Fibrosis by Disrupting Redox Homeostasis via Facilitation of NRF2–KEAP1–CUL3 Interactions in Chronic Kidney Disease. *Antioxidants.* 2020;9(9).
451. Ni Q, Xia L, Huang Y, Yuan X, Gu W, Chen Y, et al. Gut microbiota dysbiosis orchestrates vitiligo-related oxidative stress through the metabolite hippuric acid. *Microbiome.* 2025;13(1):112.

452. Saoi M, Li A, McGlory C, Stokes T, von Allmen MT, Phillips SM, et al. Metabolic Perturbations from Step Reduction in Older Persons at Risk for Sarcopenia: Plasma Biomarkers of Abrupt Changes in Physical Activity. *Metabolites*. 2019 Jul;9(7).
453. Kameda M, Teruya T, Yanagida M, Kondoh H. Frailty markers comprise blood metabolites involved in antioxidation, cognition, and mobility. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2020 Apr;117(17):9483–9.
454. Trushina E, Dutta T, Persson X-MT, Mielke MM, Petersen RC. Identification of Altered Metabolic Pathways in Plasma and CSF in Mild Cognitive Impairment and Alzheimer's Disease Using Metabolomics. *PLoS One* [Internet]. 2013;8(5):1–13. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063644>
455. De Simone G, Balducci C, Forloni G, Pastorelli R, Brunelli L. Hippuric acid: Could became a barometer for frailty and geriatric syndromes? *Ageing Res Rev*. 2021;72:101466.
456. Buccellato FR, D'Anca M, Fenoglio C, Scarpini E, Galimberti D. Role of Oxidative Damage in Alzheimer's Disease and Neurodegeneration: From Pathogenic Mechanisms to Biomarker Discovery. *Antioxidants* (Basel, Switzerland). 2021 Aug;10(9).
457. Mohammed ET, Safwat GM. Grape Seed Proanthocyanidin Extract Mitigates Titanium Dioxide Nanoparticle (TiO₂)-NPs)-Induced Hepatotoxicity Through TLR-4/NF- κ B Signaling Pathway. *Biol Trace Elem Res*. 2020 Aug;196(2):579–89.
458. Florczyk UM, Jozkowicz A, Dulak J. Biliverdin reductase: new features of an old enzyme and its potential therapeutic significance. *Pharmacol Rep*. 2008;60(1):38–48.
459. Llido JP, Jayanti S, Tiribelli C, Gazzin S. Bilirubin and Redox Stress in Age-Related Brain Diseases. *Antioxidants* (Basel, Switzerland). 2023 Jul;12(8).
460. Di Domenico F, Baroneb E, Mancuso C, Perluigi M, Cocciolo A, Mecocci P, et al. HO-1/BVR-A system analysis in plasma from probable Alzheimer's disease and mild cognitive impairment subjects: A potential biochemical marker for the prediction of the disease. *J Alzheimer's Dis*. 2012;32(2):277–89.
461. Jayanti S, Moretti R, Tiribelli C, Gazzin S. Bilirubin and inflammation in neurodegenerative and other neurological diseases. *Neuroimmunol Neuroinflammation*. 2020;7(2):92–108.
462. Johnson JW, Ascher P. Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons. *Nature*. 1987 Feb;325(6104):529–31.
463. Mark LP, Prost RW, Ulmer JL, Smith MM, Daniels DL, Strottmann JM, et al. Pictorial review of glutamate excitotoxicity: fundamental concepts for neuroimaging. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2001;22(10):1813–24.

464. Wang R, Reddy PH. Role of Glutamate and NMDA Receptors in Alzheimer's Disease. *J Alzheimer's Dis* [Internet]. 2017;57(4):1041–8. Available from: <https://doi.org/10.3233/JAD-160763>
465. Butterfield DA, Favia M, Spera I, Campanella A, Lanza M, Castegna A. Metabolic Features of Brain Function with Relevance to Clinical Features of Alzheimer and Parkinson Diseases. *Molecules* [Internet]. 2022;27(3). Available from: <https://www.mdpi.com/1420-3049/27/3/951>
466. Jia D, Wang F, Yu H. Systemic alterations of tricarboxylic acid cycle enzymes in Alzheimer's disease. *Front Neurosci*. 2023;17:1206688.
467. Kurano M, Saito Y, Yatomi Y. Comprehensive Analysis of Metabolites in Postmortem Brains of Patients with Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis*. 2024;97(3):1139–59.
468. Hertz L, Chen Y, Waagepetersen HS. Effects of ketone bodies in Alzheimer's disease in relation to neural hypometabolism, β -amyloid toxicity, and astrocyte function. *J Neurochem* [Internet]. 2015;134(1):7–20. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/jnc.13107>
469. Morris G, Maes M, Berk M, Carvalho AF, Puri BK. Nutritional ketosis as an intervention to relieve astrogliosis: Possible therapeutic applications in the treatment of neurodegenerative and neuroprogressive disorders. *Eur Psychiatry*. 2020;63(1):e8.
470. Morris G, Puri BK, Carvalho A, Maes M, Berk M, Ruusunen A, et al. Induced Ketosis as a Treatment for Neuroprogressive Disorders: Food for Thought? *Int J Neuropsychopharmacol*. 2020 Jun;23(6):366–84.
471. Maalouf M, Sullivan PG, Davis L, Kim DY, Rho JM. Ketones inhibit mitochondrial production of reactive oxygen species production following glutamate excitotoxicity by increasing NADH oxidation. *Neuroscience* [Internet]. 2007;145(1):256–64. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0306452206016617>
472. Haces ML, Hernández-Fonseca K, Medina-Campos ON, Montiel T, Pedraza-Chaverri J, Massieu L. Antioxidant capacity contributes to protection of ketone bodies against oxidative damage induced during hypoglycemic conditions. *Exp Neurol*. 2008 May;211(1):85–96.
473. Zyśk M, Beretta C, Naia L, Dakhel A, Pávénus L, Brismar H, et al. Amyloid- β accumulation in human astrocytes induces mitochondrial disruption and changed energy metabolism. *J Neuroinflammation*. 2023 Feb;20(1):43.
474. Dorninger F, Moser AB, Kou J, Wiesinger C, Forss-Petter S, Gleiss A, et al. Alterations in the Plasma Levels of Specific Choline Phospholipids in Alzheimer's Disease Mimic Accelerated Aging. *J Alzheimers Dis*. 2018;62(2):841–54.
475. Mauch DH, Nägler K, Schumacher S, Göritz C, Müller E-C, Otto A, et al. CNS

- Synaptogenesis Promoted by Glia-Derived Cholesterol. *Science* (80-). 2001;294(5545):1354–7.
476. Shepardson NE, Shankar GM, Selkoe DJ. Cholesterol level and statin use in Alzheimer disease: I. Review of epidemiological and preclinical studies. *Arch Neurol*. 2011 Oct;68(10):1239–44.
 477. Friess E, Schiffelholz T, Steckler T, Steiger A. Dehydroepiandrosterone--a neurosteroid. *Eur J Clin Invest*. 2000 Dec;30 Suppl 3:46–50.
 478. de Menezes KJ, Peixoto C, Nardi AE, Carta MG, Machado S, Veras AB. Dehydroepiandrosterone, Its Sulfate and Cognitive Functions. *Clin Pract Epidemiol Ment Health*. 2016;12:24–37.
 479. Webster SJ, Bachstetter AD, Nelson PT, Schmitt FA, Van Eldik LJ. Using mice to model Alzheimer's dementia: an overview of the clinical disease and the preclinical behavioral changes in 10 mouse models. *Front Genet*. 2014;5:88.
 480. Vuic B. Uloga dehidroepiandrosterona i njegovog sulfata te moždanog neurotrofnog čimbenika u demenciji. 2025;
 481. Solas M, Puerta E, Ramirez MJ. Treatment Options in Alzheimer's Disease: The GABA Story. *Curr Pharm Des*. 2015;21(34):4960–71.
 482. Cao Y, Zhao LW, Chen ZX, Li SH. New insights in lipid metabolism: potential therapeutic targets for the treatment of Alzheimer's disease. *Front Neurosci*. 2024;18(September).
 483. Herrington DM, Gordon GB, Achuff SC, Trejo JF, Weisman HF, Kwiterovich PO, et al. Plasma dehydroepiandrosterone and dehydroepiandrosterone sulfate in patients undergoing diagnostic coronary angiography. *J Am Coll Cardiol*. 1990;16(4):862–70.
 484. Marder W, Somers EC, Kaplan MJ, Anderson MR, Lewis EE, McCune WJ. Effects of Prasterone (dehydroepiandrosterone) on markers of cardiovascular risk and bone turnover in premenopausal women with systemic lupus erythematosus: a pilot study. *Lupus*. 2010;19(10):1229–36.
 485. Qin Y, O. Santos H, Khani V, Tan SC, Zhi Y. Effects of dehydroepiandrosterone (DHEA) supplementation on the lipid profile: A systematic review and dose-response meta-analysis of randomized controlled trials. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2020;30(9):1465–75.

POPIS KRATICA

AB – Alzheimerova bolest

AChEI – inhibitori acetilkolinesteraze

APCI – kemijska ionizacija pri atmosferskom tlaku

APOE – apolipoprotein E

APP – amiloidni prekursorski protein; sAPP – sekretorni oblik amiloidnog prekursorskog proteina

ARIA – *Amyloid-Related Imaging Abnormalities* (slikovne abnormalnosti povezane s amiloidom)

A β – amiloid β

BCAA – *branched-chain amino acid* (aminokiseline razgranatih lanaca)

BSA – *bovine serum albumin*

CE – kapilarna elektroforeza

CI – kemijska ionizacija

CID – *collision induced dissociation* (kolizijski inducirana disocijacija)

CSF – *cerebrospinal fluid* (cerebrospinalna tekućina)

CTF – C-terminalni fragment

DAB – 3,3'-diaminobenzidin

DESI – desorpcijska ESI

DG – diacilglicerol

DHA – dokosaheksaenska kiselina

DHEA(S) – dehidroepiandrosteron (sulfat)

DSM – *Diagnostic and statistical manual of mental disorders* (Dijagnostički i statistički priručnik za mentalne poremećaje)

EESI – ekstraktivna ESI

EOAD – *early-onset Alzheimer's disease* (rani oblik Alzheimerove bolesti)

EPA - eikozapentaenska kiselina

ESI – *electrospray ionization* (ionizacija elektroraspršenjem)

EtOH – etanol

FA – *formic acid* (mravlja kiselina)

FAHFA - *fatty acyl esters of hydroxy fatty acids* (ester masne kiseline ili hidroksi masna kiselina)

FDR – False Discovery Rate

FT-ICR – Fourierova ionska ciklotronska rezonanca

GABA – γ -aminobutirična kiselina

GC-MS – plinska kromatografija spregnuta sa spektrometrijom masa

HDL – *high density lipoprotein* (lipoprotein niske gustoće)

HILIC – *hydrophilic interaction LC* (kromatografija s hidrofilnom interakcijom)

HPLC/UHPLC – visokotlačna/ultravisokotlačna tekućinska kromatografija

IELC – *ion exchange cromatography* (ionsko-izmjenjivačke kromatografije)

IFN- γ – interferon- γ

IL – interleukin

IT – *ion trap* (ionska zamka)

LC-MS – tekućinska kromatografija spregnuta sa spektrometrijom masa

LDL – *low density lipoprotein* (lipoprotein niske gustoće)

LOAD – *late-onset Alzheimer's disease* (kasni oblik Alzheimerove bolesti)

LysoPC – lizofosfatidilkolin

LysoPE – lizofosfatidiletanolamin

LysoPI – lizofosfatidilinozitol

MALDI – matriks-asistirana laserska desorpcija/ionizacija

MCI – *mild cognitive impairment* (blagi neurokognitivni poremećaj)

MeOH – metanol

MFE – *molecular feature extraction* (izvlačenje molekularnih svojstava)

MG – monoacilglicerol

MHC – *major histocompatibility complex*

MMSE – *Mini-Mental state examination* (test procjene mentalnog stanja)

MRI – *magnetic resonance imaging* (magnetska rezonanca)

MTBE – metil tert-butil eter

MWM – *Morris water maze* (Morrisov vodeni labirint)

NINCDS-ADRDA – *National institute of neurological and communicative disorders and stroke-the Alzheimer's disease and related disorders association* (Nacionalni institut za neurološke poremećaje i moždani udar - Udruga za Alzheimerovu bolest i srodne poremećaje)

NIST – *National Institute of Standards and Technology Mass Spectral Library*

NMDA – N-metil-D-aspartat

NMR – nuklearna magnetska rezonanca

NPLC – *normal phase LC* (tekućinska kromatografija normalne faze)

NTF – *neurofibrillary tangles* (neurofibrilarni snopići)

(O)PLS-DA – *(Orthogonal) Partial Least Square-Discriminant analysis* ((ortogonalna) diskriminacijska analiza parcijalnih najmanjih kvadrata)

PA – fosfatidiletanolamin

Par – *Pareto* skaliranje

PBS – *phosphate buffered saline* (puferirana otopina fosfatnih soli)

PC – fosfatidilkolin

PCA – *Principal Component Analysis* (analize glavnih komponenti)

PET – pozitronska emisijska tomografija

PFA – paraformaldehid

PI – fosfatidilinozitol

PLA2 – fosfolipaza A2

PSEN – presenilin

Q – kvadrupol

QC – *quality control* (uzorci kontrole kvalitete)

QC-RSC – *QC-Robust Spline Correction*

RFE – *recursive feature extraction* (rekurzivno izvlačenja svojstava)

RNS – *reactive nitrogen species* (reaktivne kisikove vrste)

ROS – *reactive oxygen species* (reaktivne kisikove vrste)

RPLC – *reverse phase LC* (tekućinska kromatografija obrnutih faza)

RT – *retention time* (vrijeme zadržavanja)

SALDI – površinski asistirana laserska desorpcija/ionizacija

SAM – S-adenozilmetionin

SDT – *social discrimination test* (test socijalne diskriminacije)

SEC – *size exclusion chromatography* (kromatografija isključenjem po veličini)

SULT2A1 – sulfotransferaza

TCA – *Tricarboxylic acid cycle* (ciklus limunske kiseline)

TG – triacilglicerol

TGF- β – *tumor growth factor β*

TNF- α – *tumor necrosis factor α*

TOF – *time-of-flight*

UV – *unit variance*

3xTg-AD – *triple-transgenic Alzheimer's disease*

3R – *replacment, reduction, refinement*

9-HODE – 9-hidroksioktadekadienoinska kiselina

POPIS SLIKA

Slika 1. Patološke karakteristike AB-a. Proteini A β stvaraju se u membranama neurona i oligomeriziraju u izvanstaničnom prostoru, pri čemu nastaju nakupine u obliku plakova koji ometaju normalno funkcioniranje neurona i potiču upalne procese. Neurofibrilarni snopići nastaju agregacijom hiperfosforiliranog proteina tau unutar neurona, čime se narušava vezikularni transport potreban za sinaptički prijenos. Zajednički učinak ovih dvaju procesa povezuje se sa smrću neurona i atrofijom mozga, što dovodi do postupnog kognitivnog propadanja.

Slika 2. Amiloidogeni i neamiloidogeni put procesiranja proteina APP. U neamiloidogenom putu, APP se cijepa α -sekretazom, stvarajući sAPP α i CTF83 fragment, čime se sprječava stvaranje A β . U amiloidogenom putu, APP se cijepa β -sekretazom, pri čemu nastaje sAPP β i fragment CTF99 kojeg γ -sekretaza cijepa i oslobađa A β . Nakupljanjem i oligomerizacijom peptida A β , dolazi do stvaranja toksičnih nakupina, tzv. amiloidnih plakova.

Slika 3. Kontinuum AB-a: napredovanje bolesti od promjena u mozgu na molekularnoj razini do vidljivih promjena i simptoma koji ozbiljno narušavaju svakodnevno funkcioniranje.

Slika 4. Čimbenici rizika za razvoj Alzheimerove bolesti.

Slika 5. Predložene hipoteze nastanka Alzheimerove bolesti.

Slika 6. Shematski prikaz sinteze neurosteroida DHEA(S).

Slika 7. Razine DHEA(S)-a tijekom života kod muškaraca i žena.

Slika 8. Pregled različitih *omics*-znanosti poput genomike, proteomike i transkriptomike.

Slika 9. Usporedba neciljanog i ciljanog metabolomskog pristupa.

Slika 10. Prikaz tijeka metabolomskih istraživanja.

Slika 11. Shematski prikaz osnovnih dijelova tekućinske kromatografije.

Slika 12. Shematski prikaz osnovnih dijelova plinske kromatografije.

Slika 13. Princip rada ionizacije elektroraspršenjem (ESI). Djelovanjem visokog napona iz konusa se emitira mlaz tekućih kapljica (uzorak). Kako otopina u kapljicama isparava, kapljice postaju sve više nabijene i raspadaju se pri čemu nastaje mlaz pozitivno nabijenih iona.

Slika 14. Princip rada masene spektrometrije. Molekule se bombardiraju snopom elektrona, što dovodi do njihovog ioniziranja i fragmentacije. Svaka vrsta iona ima specifičan omjer mase i naboja (m/z), a budući da većina iona nosi jedan naboj, omjer m/z odgovara molekulskoj masi iona. Ioni zatim prolaze kroz magnetsko i električno polje prema detektoru, gdje se bilježi maseni spektar.

Slika 15. LC uređaj 1290 infinity II (Agilent Technologies) spojen na detektor Agilent 6550 iFunnel Q-TOF koji se nalazi u metabolomskoj jedinici na Institutu Ruđer Bošković.

Slika 16. GC uređaj Agilent 7890A spojen s masenim spektrometrom Agilent Technologies 5975 s jednostrukim kvadrupolom, smješten u metabolomskoj jedinici na Institutu Ruđer Bošković.

Slika 17. Shematski prikaz izdvajanja plazme iz uzoraka krvi.

Slika 18. 3Tg-AD miš.

Slika 19. Princip rada mikro-osmotske pumpice.

Slika 20. Morrisov vodeni labirint.

Slika 21. Test socijalne diskriminacije.

Slika 22. Y labirint test.

Slika 23. Prikaz postupka imunohistokemijskog bojanja za detekciju amiloidnih plakova na uzorcima hipokampusa miševa.

Slika 24. Prikaz postupka pripreme uzoraka homogenata tkiva i plazme za analizu metodom LC-MS.

Slika 25. Prikaz postupka pripreme uzoraka homogenata tkiva i plazme za analizu metodom GC-MS.

Slika 26. Prikaz postupka obrade podataka dobivenih LC-MS analizom.

Slika 27. Prikaz obrade podataka dobivenih GC-MS analizom.

Slika 28. Grafički prikaz rezultata analize PCA na podacima dobivenima metabolomskim profiliranjem uzoraka ljudske plazme metodom LC-MS. Metodom LC-MS analizirani su uzorci plazmi zdravih kontrolnih ispitanika, ispitanika s MCI-jem te bolesnika oboljelih od AB-a. **A)** Neciljano metabolomsko profiliranje metodom LC-MS u pozitivnom načinu ionizacije ($R^2X(\text{cum}) = 0,751$); **B)** Neciljano metabolomsko profiliranje metodom LC-MS u negativnom načinu ionizacije ($R^2X(\text{cum}) = 0,368$).

Slika 29. Grafički prikaz rezultata analize OPLS-DA na podacima dobivenima metabolomskim profiliranjem uzoraka ljudske plazme metodom LC-MS u pozitivnom načinu ionizacije. **A)** Analiza OPLS-DA na podacima dobivenima metabolomskim profiliranjem uzoraka plazme bolesnika s AB-om i zdravih kontrolnih ispitanika ($R^2 = 0,963$; $Q^2 = 0,927$) **B)** Analiza OPLS-DA na podacima dobivenima metabolomskim profiliranjem uzoraka plazme ispitanika s MCI-jem i zdravih kontrolnih ispitanika ($R^2 = 0,924$; $Q^2 = 0,792$) **C)** Analiza OPLS-DA na podacima dobivenima metabolomskim profiliranjem uzoraka plazme bolesnika s AB-om i ispitanika s MCI-jem ($R^2 = 0,971$; $Q^2 = 0,691$).

Slika 30. Grafički prikaz rezultata analize OPLS-DA na podacima dobivenima metabolomskim profiliranjem uzoraka ljudske plazme metodom LC-MS u negativnom načinu ionizacije. **A)** Analiza OPLS-DA na podacima dobivenima metabolomskim profiliranjem uzoraka plazme bolesnika s AB-om i zdravih kontrolnih ispitanika ($R^2 = 0,969$; $Q^2 = 0,809$) **B)** Analiza OPLS-DA na podacima dobivenima metabolomskim profiliranjem uzoraka plazme ispitanika s MCI-jem i zdravih kontrolnih ispitanika ($R^2 = 0,966$; $Q^2 = 0,776$) **C)** Analiza OPLS-DA na podacima dobivenima metabolomskim profiliranjem uzoraka plazme bolesnika s AB-om i ispitanika s MCI-jem ($R^2 = 0,656$; $Q^2 = 0,307$).

Slika 31. Grafički prikaz rezultata analize PCA ($R^2X(\text{cum}) = 0,753$) na podacima dobivenima metabolomskim profiliranjem uzoraka ljudske plazme metodom GC-MS. Metodom GC-MS analizirani su uzorci plazmi zdravih kontrolnih ispitanika, ispitanika s MCI-jem te bolesnika oboljelih od AB-a.

Slika 32. Grafički prikaz rezultata analize OPLS-DA na podacima dobivenima metabolomskim profiliranjem uzoraka ljudske plazme metodom GC-MS. **A)** Analiza OPLS-DA na podacima dobivenima metabolomskim profiliranjem uzoraka plazme bolesnika s AB-om i zdravih kontrolnih ispitanika ($R^2 = 0,934$; $Q^2 = 0,869$) **B)** Analiza OPLS-DA na podacima dobivenima metabolomskim profiliranjem uzoraka plazme ispitanika s MCI-jem i zdravih kontrolnih ispitanika ($R^2 = 0,884$; $Q^2 = 0,851$) **C)** Analiza OPLS-DA na podacima dobivenima metabolomskim profiliranjem uzoraka plazme bolesnika s AB-om i ispitanika s MCI-jem ($R^2 = 0,600$; $Q^2 = 0,335$).

Slika 33. Imunohistokemijska vizualizacija nakupina amiloida ($A\beta$ -42) u mozgu miševa 3xTg-AD. **A)** i **B)** Prerez hipokampusa (debljine 30 μm) miša iz kontrolne skupine koja nema patologiju koja odgovara AB-u. **C), D)** i **E)** Prerez hipokampusa (debljine 30 μm) miševa 3xTg-AD s razvijenom patologijom koja odgovara AB-u.

Slika 34. Usporedba rezultata testa ponašanja MWM između kontrolne skupine, miševa 3Tg-AD te miševa 3xTg-AD koji su primali terapiju lijekom DHEAS ($H = 7,60$; $p = 0,022$;

Kruskal-Wallis H test)). Na y-osi prikazan je postotak vremena (%) provedenog u zoni u kojoj se prethodno nalazila platforma.

Slika 35. Usporedba broja ulazaka u krakove Y-labirinta između kontrolne skupine, miševa 3xTg-AD te miševa 3xTg-AD koji su primali terapiju lijekom DHEAS ($H = 11,58$; $p = 0,003$; Kruskal-Wallis H test).

Slika 36. Usporedba postotka spontanijih alternacija u Y-labirintu između kontrolne skupine, miševa 3xTg-AD te miševa 3xTg-AD koji su primali terapiju lijekom DHEAS ($H = 3,25$; $p = 0,197$; Kruskal-Wallis H test).

Slika 37. Usporedba rezultata testa ponašanja SDT između kontrolne skupine, miševa 3xTg-AD te miševa 3xTg-AD koji su primali terapiju lijekom DHEAS ($H = 5,63$; $p = 0,098$; Kruskal-Wallis H test). Na y-osi prikazano je vrijeme (s) koje su životinje provele istražujući novu, nepoznatu životinju.

Slika 38. Usporedba rezultata nesocijalnog ponašanja (test SDT) između kontrolne skupine, miševa 3xTg-AD te miševa 3xTg-AD koji su primali terapiju lijekom DHEAS ($H = 16,01$; $p < 0,001$; Kruskal-Wallis H test).

Slika 39. Grafički prikaz rezultata analize PCA na podacima dobivenima metabolomskim profiliranjem uzoraka mišje plazme metodom LC-MS. Metodom LC-MS analizirani su uzorci plazmi kontrolnih miševa 3xTg(+/+), 3xTg-AD miševa i 3xTg-AD miševa tretiranih lijekom DHEAS. **A)** Neciljano metabolomsko profiliranje metodom LC-MS u pozitivnom načinu ionizacije; **B)** Neciljano metabolomsko profiliranje metodom LC-MS u negativnom načinu ionizacije.

Slika 40. Grafički prikaz rezultata analize OPLS-DA na podacima dobivenima metabolomskim profiliranjem uzoraka mišje plazme metodom LC-MS u pozitivnom načinu ionizacije. **A)** Analiza OPLS-DA na podacima dobivenima metabolomskim profiliranjem uzoraka plazme kontrolnih 3xTg(+/+) i miševa 3xTg-AD **B)** Analiza OPLS-DA na podacima dobivenima metabolomskim profiliranjem uzoraka plazme kontrolnih miševa 3xTg(+/+) i miševa 3xTg-AD tretiranih lijekom DHEAS **C)** Analiza OPLS-DA na podacima dobivenima metabolomskim profiliranjem uzoraka plazme miševa 3xTg-AD i miševa 3xTg-AD tretiranih lijekom DHEAS.

Slika 41. Grafički prikaz rezultata analize OPLS-DA na podacima dobivenima metabolomskim profiliranjem uzoraka mišje plazme metodom LC-MS u negativnom načinu ionizacije. **A)** Analiza OPLS-DA na podacima dobivenima metabolomskim profiliranjem uzoraka plazme kontrolnih 3xTg(+/+) i miševa 3xTg-AD **B)** Analiza OPLS-DA na podacima dobivenima metabolomskim profiliranjem uzoraka plazme kontrolnih miševa 3xTg(+/+) i miševa 3xTg-AD tretiranih lijekom DHEAS **C)** Analiza OPLS-DA na

podacima dobivenima metaboloskim profiliranjem uzoraka plazme miševa 3xTg-AD i miševa 3xTg-AD tretiranih lijekom DHEAS.

Slika 42. Grafički prikaz rezultata analize PCA i OPLS-DA na podacima dobivenima metaboloskim profiliranjem uzoraka mišje plazme metodom GC-MS. Metodom GC-MS analizirani su uzorci plazmi kontrolnih miševa 3xTg(+/+), 3xTg-AD miševa i 3xTg-AD miševa tretiranih lijekom DHEAS. **A)** Grafički prikaz analize PCA na podacima dobivenima neciljanom metaboloskom analizom plazme kontrolnih miševa, 3xTg-AD i miševa 3xTg-AD tretiranih lijekom DHEAS; **B)** Analiza OPLS-DA na podacima dobivenima metaboloskim profiliranjem uzoraka plazme kontrolnih 3xTg(+/+) i miševa 3xTg-AD **C)** Analiza OPLS-DA na podacima dobivenima metaboloskim profiliranjem uzoraka plazme kontrolnih miševa 3xTg(+/+) i miševa 3xTg-AD tretiranih lijekom DHEAS **D)** Analiza OPLS-DA na podacima dobivenima metaboloskim profiliranjem uzoraka plazme miševa 3xTg-AD i miševa 3xTg-AD tretiranih lijekom DHEAS.

Slika 43. Grafički prikaz rezultata analize PCA na podacima dobivenima metaboloskim profiliranjem uzoraka tkiva mišjeg mozga metodom LC-MS. Metodom LC-MS analizirani su uzorci tkiva mozga kontrolnih miševa 3xTg(+/+), 3xTg-AD miševa i 3xTg-AD miševa tretiranih lijekom DHEAS. **A)** Neciljano metabolosko profiliranje metodom LC-MS u pozitivnom načinu ionizacije; **B)** Neciljano metabolosko profiliranje metodom LC-MS u negativnom načinu ionizacije.

Slika 44. Grafički prikaz rezultata analize OPLS-DA na podacima dobivenima metaboloskim profiliranjem uzoraka tkiva mišjeg mozga metodom LC-MS u pozitivnom načinu ionizacije. **A)** Analiza OPLS-DA na podacima dobivenima metaboloskim profiliranjem uzoraka tkiva mozga kontrolnih 3xTg(+/+) i miševa 3xTg-AD **B)** Analiza OPLS-DA na podacima dobivenima metaboloskim profiliranjem uzoraka tkiva mozga kontrolnih miševa 3xTg(+/+) i miševa 3xTg-AD tretiranih lijekom DHEAS **C)** Analiza OPLS-DA na podacima dobivenima metaboloskim profiliranjem uzoraka tkiva mozga miševa 3xTg-AD i miševa 3xTg-AD tretiranih lijekom DHEAS.

Slika 45. Grafički prikaz rezultata analize OPLS-DA na podacima dobivenima metaboloskim profiliranjem uzoraka tkiva mišjeg mozga metodom LC-MS u negativnom načinu ionizacije. **A)** Analiza OPLS-DA na podacima dobivenima metaboloskim profiliranjem uzoraka tkiva mozga kontrolnih 3xTg(+/+) i miševa 3xTg-AD **B)** Analiza OPLS-DA na podacima dobivenima metaboloskim profiliranjem uzoraka tkiva mozga kontrolnih miševa 3xTg(+/+) i miševa 3xTg-AD tretiranih lijekom DHEAS **C)** Analiza OPLS-DA na podacima dobivenima metaboloskim profiliranjem uzoraka tkiva mozga miševa 3xTg-AD i miševa 3xTg-AD tretiranih lijekom DHEAS.

Slika 46. Grafički prikaz rezultata analize PCA i OPLS-DA na podacima dobivenima metabolomskim profiliranjem uzoraka mišje plazme metodom GC-MS. Metodom GC-MS analizirani su uzorci plazmi kontrolnih miševa 3xTg(+/+), 3xTg-AD miševa i 3xTg-AD miševa tretiranih lijekom DHEAS. **A)** Grafički prikaz analize PCA na podacima dobivenima neciljanom metabolomskom analizom plazme kontrolnih miševa, 3xTg-AD i miševa 3xTg-AD tretiranih lijekom DHEAS; **B)** Analiza OPLS-DA na podacima dobivenima metabolomskim profiliranjem uzoraka plazme kontrolnih 3xTg-(+/+) i miševa 3xTg-AD **C)** Analiza OPLS-DA na podacima dobivenima metabolomskim profiliranjem uzoraka plazme kontrolnih miševa 3xTg-(+/+) i miševa 3xTg-AD tretiranih lijekom DHEAS **D)** Analiza OPLS-DA na podacima dobivenima metabolomskim profiliranjem uzoraka plazme miševa 3xTg-AD i miševa 3xTg-AD tretiranih lijekom DHEAS.

Slika 47. Aminokiseline kao izvor intermedijera za normalno funkcioniranje TCA ciklusa.

Slika 48. Shematski prikaz metabolizma lipida.

POPIS TABLICA

Tablica 1. Razlike između analitičkih platformi i detekcijskih metoda koje se najčešće koriste u metabolomici.

Tablica 2. Demografski i klinički podaci zdravih kontrolnih ispitanika, ispitanika s MCI-jem i osoba oboljelih od AB-a.

Tablica 3. Značajno promijenjeni metaboliti u uzorcima ljudske plazme, detektirani metodom LC-MS/MS u pozitivnom i negativnom načinu ionizacije, između bolesnika oboljelih od AB-a, ispitanika s MCI-jem i zdravih kontrola.

Tablica 4. Značajno promijenjeni metaboliti u uzorcima ljudske plazme, detektirani metodom GC-MS, između bolesnika oboljelih od AB-a, ispitanika s MCI-jem i zdravih kontrola.

Tablica 5. Značajno promijenjeni metaboliti u uzorcima mišje plazme detektirani metodom LC-MS, u pozitivnom i negativnom načinu ionizacije, između kontrolnih 3xTg(+/+) miševa te miševa 3xTg-AD koji nisu i onih koji jesu tretirani lijekom DHEAS (3xTg-AD+DHEAS).

Tablica 6. Značajno promijenjeni metaboliti u uzorcima mišje plazme detektirani metodom GC-MS, između kontrolnih 3xTg(+/+) miševa te miševa 3xTg-AD koji nisu i onih koji jesu tretirani lijekom DHEAS (3xTg-AD+DHEAS).

Tablica 7. Značajno promijenjeni metaboliti tkiva mišjeg mozga detektirani metodom LC-MS, u pozitivnom i negativnom načinu ionizacije, između kontrolnih 3xTg(+/+) miševa te miševa 3xTg-AD koji nisu i onih koji jesu tretirani lijekom DHEAS (3xTg-AD+DHEAS).

Tablica 8. Značajno promijenjeni metaboliti tkiva mišjeg mozga detektirani metodom GC-MS između kontrolnih 3xTg(+/+) miševa te miševa 3xTg-AD koji nisu i onih koji jesu tretirani lijekom DHEAS (3xTg-AD+DHEAS).

ŽIVOTOPIS

Tina Ćurković (djevojački Miloš)

Email: Tina.Milos@irb.hr

RADNO ISKUSTVO:

2021. – danas – Asistent, Laboratorij za molekularnu neuropsihijatriju, Zavod za molekularnu medicinu, Institut Ruđer Bošković, Zagreb, Hrvatska

OBRAZOVANJE:

2021. – danas Doktorand, Doktorski studij Medicinske kemije, Fakultet za biotehnologiju i razvoj lijekova, Sveučilište u Rijeci

2018. – 2021. – Diplomski studij Eksperimentalne biologije, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu

2015. – 2018. – Preddiplomski studij Biologije, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu

ZNANSTVENO USAVRŠAVANJE:

25.09.2023. – 30.09.2023. – Kratkotrajni posjet Institutu za mikrobiologiju i imunologiju, Medicinski fakultet, Sveučilište u Ljubljani, Slovenija

13.02.2023. – 25.02.2023. – Posjet Laboratoriju za istraživanje ponašanja i stresa, Institut za Fiziologiju, Sveučilište u Pečuhu, Mađarska

16.10.2022. -22.10.2022. - Posjet Laboratoriju za istraživanje ponašanja i stresa, Institut za Fiziologiju, Sveučilište u Pečuhu, Mađarska

08.11.2021. – 11.11.2021. - Posjet Laboratoriju za istraživanje ponašanja i stresa, Institut za eksperimentalnu medicinu, Sveučilište u Budimpešti, Mađarska

10. mjesec 2021. – Tečaj za osposobljavanje osoba koje rade s pokusnim životinjama i životinjama za proizvodnju bioloških pripravaka (kategorija B)

01.07.2019. – 01.09.2019. – Ljetna laboratorijska praksa, Odjel za vaskularnu biologiju i trombozu, Medicinski fakultet, Sveučilište u Beču

KONFERENCIJE I RADIONICE:

16.06.2025. – 19.06.2025. – FENS Regional Meeting 2025, Oslo, Norveška.

Poster: *Metabolomic analysis of 3xTg-AD mice plasma: exploring biomarkers and evaluating effects of dehydroepiandrosterone sulphate treatment*

25.06.2024. – 29.06.2024. – FENS Forum 2024 - International Neuroscience Conference, Beč, Austrija.

Poster: *Therapeutic potential of BDNF and neurosteroids DHEA and DHEAS in an In vitro model of Parkinson's disease*

06.06.2024. – 12.06.2024. – Radionica "Biostatistika u R-u", Zagreb, Hrvatska

16.05.2024. – 18.05.2024. – Science and Us, 2nd Biomedicine and Health PhD Students Congress, Rijeka, Hrvatska.

Poster: *Metabolic profiling of Alzheimer's disease: untargeted metabolomics analysis of plasma samples*

26.04.2024. – 27.04.2024. – 8th Faculty of Science PhD Student Symposium, Zagreb, Hrvatska. Poster: *Therapeutic potential of neurosteroids DHEA/S and neurotrophin BDNF on an in vitro model of Alzheimer's disease and Parkinson's disease*

28.09.2023. – 30.09.2023. – SiNAPSA Neuroscience Conference, Ljubljana Slovenija.

Usmeno predavanje i poster: *Brain-derived neurotrophic factor and cognitive decline in patients diagnosed with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease*

14.09.2023. – Dani doktoranada, Fakultet za biotehnologiju i razvoj lijekova, Sveučilište u Rijeci, Hrvatska.

Usmeno predavanje: *Metabolic approach in the discovery of potential biomarkers for Alzheimer's Disease*

22.09.2022. – 25.09.2022. - 10th Croatian Congress of Pharmacology with International Participation and 1st Croatian Congress of Clinical Pharmacology with International Participation, Opatija, Hrvatska.

Poster: *The protective actions of DHEA/S and BDNF in an in vitro model of Parkinson's disease*

09.07.2022. – 13.07.2022. - FENS Forum 2022 - International Neuroscience Conference, Pariz, Francuska.

Poster: *Neuroprotective effects of DHEA(S) and BDNF in an in vitro model of Parkinson's disease*

30.06.2022. – 03.07.2022. - ALS Society of Canada Symposium on Inflammation & Proteinopathy in ALS/FTD, Rijeka, Hrvatska.

Poster: *Brain-derived neurotrophic factor (BDNF), amyloid β 1–42 and apolipoprotein E genotype as a potential biomarkers of different types of dementia*

23.04.2022. – 24.04.2022. - 6th Faculty of Science PhD Student Symposium, Zagreb, Hrvatska

Poster: *Prevention and treatment of vascular dementia: exploring the neuroprotective potential of dehydroepiandrosterone (DHEA) and DHEA sulphate (DHEAS)*

2022. Radionica: "Excel or how to create tables, graphs and formulas", Zagreb, Hrvatska

2022. Radionica: "Word or how to create research paper"

2022. Seminar "A Charles River-Hosted JAX® Webinar: Comparing Immunodeficient Models for Cancer, Immunity, and Transplant Research" and "A Charles River-Hosted JAX® Webinar: Study Considerations and Preclinical Testing to Study Aging"

2021. Early-Stage Researcher's Retreat, Alliance4Life

NAGRADE I STIPENDIJE:

5.mjesec 2025. – Godišnja nagrada Instituta Ruđer Bošković za najbolje znanstvene radove u 2023. godini: Metabolic profiling of Alzheimer's disease: Untargeted metabolomics analysis of plasma samples., published at Progress in Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry 127 (2023)

2023. Tempus Public Foundation – Bilateral Scholarship – bilateralna stipendija

2023. *Travel Grant* za sudjelovanje na konferenciji: *Sinapsa Neuroscience Conference*

2018. CEEPUS (Central European Exchange Programme for University Studies) stipendija za razmjenu studenata

2017. STEM (Science, Technology, Engineering, and Mathematics) stipendija

2015. – 2020. – Stipendija grada Sinja

PUBLIKACIJE:

Lower plasma DHEAS and BDNF levels as indicators of cognitive decline. Konjevod M, Balic N, Tudor L, Uzun S, Nikolac Perkovic M, Vuic B, **Milos T**, Nedic Erjavec G, Mimica N, Pivac N, Svob Strac D. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 2026 Jan 3;144:111605. doi: 10.1016/j.pnpbp.2026.111605.

BDNF Val66Met Genotype, DNA Methylation, mRNA, and Protein Levels as Potential Blood-Based Biomarkers for Dementia and Cognitive Decline. Tudor L, Videtic Paska A, Konjevod M, Balic N, Nikolac Perkovic M, Uzun S, Vuic B, **Milos T**, Nedic Erjavec G, Mimica N, Kouter K, Pivac N, Svob Strac D. Int J Mol Sci. 2025 Sep 15;26(18):8987. doi: 10.3390/ijms26188987.

Extracellular vesicles as a promising tool in neuropsychiatric pharmacotherapy application and monitoring. Balic N, Nikolac Perkovic M, **Milos T**, Vuic B, Kurtovic Kodzoman M, Svob Strac D, Nedic Erjavec G. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 2025 Jun 20;139:111393. doi: 10.1016/j.pnpbp.2025.111393.

Neuroprotective Effects of Dehydroepiandrosterone Sulphate Against A β Toxicity and Accumulation in Cellular and Animal Model of Alzheimer's Disease. Vuic B, **Milos T**, Kvak E, Konjevod M, Tudor L, Farkas S, Nedic Erjavec G, Nikolac Perkovic M, Zelena D, Svob Strac D. Biomedicines. 2025 Feb 11;13(2):432. doi: 10.3390/biomedicines13020432.

Cerebrospinal fluid in the differential diagnosis of Alzheimer's disease: an update of the literature. **Milos T**, Vuic B, Balic N, Farkas V, Nedic Erjavec G, Svob Strac D, Nikolac

Perkovic M, Pivac N. Expert Rev Neurother. 2024Nov;24(11):1063-1079. doi: 10.1080/14737175.2024.2400683.

Overview of metabolomic aspects in postpartum depression. Konjevod M, Gredicak M, Vuic B, Tudor L, Nikolac Perkovic M, **Milos T**, Svob Strac D, Pivac N, Nedic Erjavec G. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 2023 Dec 20;127:110836. doi: 10.1016/j.pnpbp.2023.110836.

Pharmacogenomics of Dementia: Personalizing the Treatment of Cognitive and Neuropsychiatric Symptoms. Vuic B¹, **Milos T**¹, Tudor L, Nikolac Perkovic M, Konjevod M, Nedic Erjavec G, Farkas V, Uzun S, Mimica N, Svob Strac D. Genes (Basel). 2023 Nov 6;14(11):2048. doi: 10.3390/genes14112048.

Metabolic profiling of Alzheimer's disease: Untargeted metabolomics analysis of plasma samples. **Milos T**, Rojo D, Nedic Erjavec G, Konjevod M, Tudor L, Vuic B, Svob Strac D, Uzun S, Mimica N, Kozumplik O, Barbas C, Zarkovic N, Pivac N, Nikolac Perkovic M. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 2023 Dec 20;127:110830. doi: 10.1016/j.pnpbp.2023.110830.

Relationship between Brain-Derived Neurotrophic Factor and Cognitive Decline in Patients with Mild Cognitive Impairment and Dementia. Nikolac Perkovic M, Borovecki F, Filipcic I, Vuic B, **Milos T**, Nedic Erjavec G, Konjevod M, Tudor L, Mimica N, Uzun S, Kozumplik O, Svob Strac D, Pivac N. Biomolecules. 2023 Mar 21;13(3):570. doi: 10.3390/biom13030570.

Difference in Methylation and Expression of Brain-Derived Neurotrophic Factor in Alzheimer's Disease and Mild Cognitive Impairment. Kouter K, Nikolac Perkovic M, Nedic Erjavec G, **Milos T**, Tudor L, Uzun S, Mimica N, Pivac N, Videtic Paska A. Biomedicines. 2023 Jan 17;11(2):235. doi:10.3390/biomedicines11020235.

Cannabinoid CB2 Receptors in Neurodegenerative Proteinopathies: New Insights and Therapeutic Potential. Vuic B¹, **Milos T**¹, Tudor L, Konjevod M, Nikolac Perkovic M, Jazvinscak Jembrek M, Nedic Erjavec G, Svob Strac D. Biomedicines. 2022 Nov 22;10(12):3000. doi: 10.3390/biomedicines10123000.

Tailoring the therapeutic interventions for behavioral and psychological symptoms of dementia. Vuic B, Konjevod M, Tudor L, **Milos T**, Nikolac Perkovic M, Nedic Erjavec G, Pivac N, Uzun S, Mimica N, Svob Strac D. Expert Rev Neurother. 2022 Aug;22(8): 707-720. doi: 10.1080/14737175.2022.2112668.

PROJEKTI:

20.12.2024. – 19.12.2027. - Neuroprotective potential of phlorotannins from the Adriatic Sea macroalgae on a zebrafish Danio rerio model of Parkinson's disease. Voditelj: dr.sc. Sanja Babić Brčić

2021 – 2024. - Testing dehydroepiandrosterone as possible treatment for Alzheimer disorder using in vitro and in vivo models". Voditelj: dr.sc. Dubravka Švob Štrac
31.01.2020 – 30.01.2024. - "Therapeutic potential of neurosteroids and neurotrophins in dementia". Voditelj: dr.sc. Dora Zelena

AKTIVNOSTI:

2022. i 2025. – Popularizacija znanosti na Otvorenim Danima Instituta Ruđer Bošković
2018. – organizacija i sudjelovanje na manifestaciji: „Dan i Noć Biologije", na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu

ČLANSTVA:

Hrvatsko biološko društvo, Hrvatsko farmakološko društvo, Hrvatsko društvo za neuroznanost, Hrvatsko društvo za znanost o laboratorijskim životinjama, Hrvatsko društvo za farmakogenomiku i personaliziranu terapiju