

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**

**Přírodovědecká fakulta**

**Katedra Antropologie a genetiky člověka**

Studijní program: Antropologie a genetika člověka



Mgr. Gabriela Vacínová

**Fyziologie přirozeného a patologického stárnutí zaměřená na studium  
biochemických a genetických markerů u pacientů s Alzheimerovou nemocí**

Physiology of natural and pathological aging focused on studying biochemical and  
genetic markers in patients with Alzheimer's disease

Disertační práce

Vedoucí závěrečné práce: RNDr. Markéta Vaňková, Ph.D.

Praha, 2019

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně, a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 11. 3. 2019

Podpis.....

## **Poděkování:**

Ráda bych na tomto místě poděkovala své školitelce RNDr. Markétě Vaňkové, Ph.D. za odborné vedení práce, rady a pomoc během celého studia i za přátelský přístup. Dále bych chtěla poděkovat celému Oddělení molekulární endokrinologie Endokrinologického ústavu v Praze za vytvoření příjemného pracovního prostředí, vstřícnost, ochotu a samozřejmě i ředitelce Endokrinologického ústavu doc. RNDr. Běle Bendlové CSc., bez které bych neměla možnost být součástí výzkumného týmu. Poděkování patří i dalším kolegům Endokrinologického ústavu, kteří se do studie zapojili.

Děkuji doc. MUDr. Robertu Rusinovi, Ph.D. a jeho kolegům z Neurologického oddělení Thomayerovy nemocnice v Praze za výběr vhodných pacientů s Alzheimerovou nemocí. Velký dík patří samotným pacientům, jejich rodinám a zdravým dobrovolníkům, kteří se studie zúčastnili.

Na závěr bych chtěla poděkovat své rodině a přátelům, kteří mi po celou dobu studia byli velkou oporou, i když to chvílemi nebylo snadné. V neposlední řadě bych za podporu a pochopení chtěla poděkovat svému partnerovi, který mi v závěru studia dodal potřebnou motivaci práci dokončit.

## Abstrakt

Alzheimerova nemoc (Alzheimer's disease, AD) je neurodegenerativní onemocnění, na jehož vzniku a rozvoji se podílejí faktory genetické, biochemické i faktory vnějšího prostředí. AD postihuje převážně osoby starší 60 let, ale může se vyskytovat i v časně formě, která je mnohem progresivnější a závažnější. Charakteristickým rysem AD je ztráta kognitivních funkcí, na histologické úrovni pak přítomnost senilních plaků a neurofibrilárních klubek. Diagnostika AD je velmi problematická, s jistotou lze toto onemocnění prokázat až po smrti pacienta. Jediným známým genem, který souvisí s rizikem rozvoje AD je gen pro *Apolipoprotein E* a jeho riziková alela  $\epsilon 4$ . Z celogenomových asociačních studií vzešlo další množství kandidátních genů pro AD, které by s tímto onemocněním mohly souviset. Kromě genetického pozadí se na vzniku AD podílejí i změny v některých biochemických parametrech včetně steroidních hormonů.

Disertační práce je rozdělena na dvě části – část genetickou a část biochemickou. Genetická část práce je zaměřena na vybrané polymorfismy v kandidátních genech pro AD a na jejich případnou souvislost s poruchami glukózového metabolismu. Celkem bylo vyšetřeno 2172 osob (550 pacientek s gestačním diabetem, 391 pacientů s diabetem 2. typu, 116 jedinců s porušenou glukózovou tolerancí a 1115 odpovídajících zdravých kontrol). Metodou Real-Time PCR byly detekovány vybrané polymorfismy v genech *BINI*, *CLU*, *CRI* a *PICALM*. Výsledky ukázaly, že varianta rs3851179 v genu *PICALM* je asociována se zvýšeným rizikem rozvoje gestačního diabetu, a že souvisí s porušenou glukózovou tolerancí. Dále se tato část práce zaměřila na hledání nových variant v některých exonech vybraných kandidátních genů pro AD. Celkem bylo vyšetřeno 173 osob (97 pacientů s AD a 76 seniorských kontrol). Metodou masivně paralelního sekvenování byly vyšetřeny vybrané exony v genech *APOE*, *BINI*, *CLU* a *CRI*. Všechny varianty nalezené v této části práce byly již popsány. V rámci této studie nebyla nalezena žádná nová varianta, která by mohla mít souvislost s AD.

Biochemická část práce se zaměřila na spektrum vybraných adipokinů, cytokinů, inkretinů a parametrů spojených s neurodegenerací. Celkem bylo vyšetřeno 163 osob (87 pacientů s AD a 76 kontrolních seniorů). Vyšetření byla provedena pomocí multiplexové ELISA metody. Výsledky ukázaly vyšší hladiny visfatinu, resistinu, GLP-1, sCD40L a enolasy-2 u pacientů s AD oproti kontrolním seniorům. Dále byly u pacientů s AD nalezeny

mnohonásobně vyšší hladiny chemokinu RANTES ve srovnání s kontrolním souborem. Dále se tato část práce zaměřila na hladiny steroidních hormonů a na případnou asociaci mezi poměry jejich konjugovaných a nekonjugovaných forem s AD. Vyšetření byla provedena metodou plynové chromatografie s hmotnostním spektrometrem. Výsledky ukázaly snížené hladiny C19 steroidů u pacientů s AD, které ukazují na sníženou aktivitu enzymů v *zona reticularis* nadledviny. Dále byly u pacientů s AD nalezeny vyšší hladiny C21 steroidů ve srovnání s kontrolním souborem, které ukazují na zvýšenou aktivitu enzymů v *zona fasciculata* nadledviny. U pacientů s AD byly nalezeny nižší poměry mezi konjugovanými a nekonjugovanými C19 steroidy. Tento výsledek opět ukazuje na nižší aktivitu enzymů v *zona reticularis*, konkrétně na utlumenou sulfonaci těchto steroidů pomocí enzymu *sulfotransferase family 2A member 1* (SULT2A1).

Disertační práce pomohla přispět k poodhalení genetického i biochemického pozadí AD, které je velmi komplikované. Společně s dalšími studii, které se problematikou AD zabývají, by v budoucnu mohla přispět k vytvoření modelu pro lepší diagnostiku AD.

## Abstract

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disorder where genetic, biochemical and environmental factors are involved. AD mainly affects individuals over 60 years of age, but an early form of AD which is both more progressive and more serious also exists. The loss of cognitive function is typical for AD, on histological level senile plaques and neurofibrillary tangles are typically present. Diagnostics of AD is very problematic and accurate diagnosis is only possible *post mortem*. The only known gene that is associated with the risk of AD is *Apolipoprotein E*, respectively its allele  $\epsilon 4$ . Genome-wide association studies revealed more candidate genes for AD that have a connection with the disease. Except genetics background, there are some changes in biochemical markers including steroid hormones that can contribute to AD development.

This thesis has two parts – a genetic and a biochemical one. The genetic part focuses on selected polymorphisms in candidate genes for AD and on its eventual connection with disorders of glucose metabolism. In total there were 2172 persons (550 women with gestational diabetes, 391 patients with type 2 diabetes mellitus, 116 persons with impaired glucose tolerance and 1115 appropriate healthy controls) examined. Using Real-Time PCR, polymorphisms in *BINI*, *CLU*, *CR1* and *PICALM* genes were detected. Our results show that variant rs3851179 in *PICALM* gene is associated with higher risk of gestational diabetes and that it has a connection with impaired glucose tolerance. This part of thesis also focuses on searching for new variants in some exons in selected candidate genes for AD. In total there were 173 persons (97 patients with AD and 76 healthy senior controls) examined. Thanks to massive parallel sequencing selected exons in *APOE*, *BINI*, *CLU* and *CR1* genes were examined. All variants found in our study have already been discovered and described. No new variants which could be associated with AD were found.

The biochemical part of this thesis focuses on the spectrum of adipokines, cytokines, incretines and neurodegenerative parameters. In total there were 163 persons (87 patients with AD and 76 healthy seniors) examined. The analysis was performed by multiplex ELISA method. Our results show elevated levels of visfatin, resistin, GLP-1, sCD40L and enolase-2 in AD patients compared to senior controls. In AD patients we also detected manifold increased levels of chemokine RANTES compared to controls. Further, this part of thesis focuses on steroid hormone levels and its potential association of their conjugated and unconjugated ratios with AD. The analysis was done using a gas

chromatography-mass spectrometry method. The results show lower levels of C19 steroids in AD patients that show reduced enzyme activity in adrenal *zona reticularis*. Furthermore, patients with AD have higher levels of C21 steroids compared to controls that show increased enzyme activity in adrenal *zona fasciculata*. We found lower ratios between conjugated and unconjugated C19 steroids in AD patients. This result shows again a lower enzyme activity in adrenal *zona reticularis*, specifically an attenuated sulfonation of these steroids by enzyme *sulfotransferase family 2A member 1* (SULT2A1).

This Ph.D. thesis contributes to the elucidation of genetic and biochemical background of AD which is very complex. Together with other studies involved in AD problematics it could contribute to the creation of a model to improve the diagnostics of AD.

## **Obsah**

Seznam zkratk	11
1. Úvod	13
2. Literární přehled	15
2.1. Epidemiologie Alzheimerovy nemoci	15
2.2. Patofyziologie Alzheimerovy nemoci	15
2.3. Genetika Alzheimerovy nemoci	16
2.3.1. Časná forma Alzheimerovy nemoci	17
2.3.2. Pozdní forma Alzheimerovy nemoci	17
2.4. Biochemické pozadí Alzheimerovy nemoci	25
2.4.1. Alzheimerova nemoc a adipokiny	26
2.4.2. Alzheimerova nemoc a cytokiny	33
2.4.3. Alzheimerova nemoc a parametry neurodegenerace	36
2.4.4. Alzheimerova nemoc a steroidní hormony	39
3. Hypotézy a cíle práce	42
3.1. Genetická část	42
3.2. Biochemická část	43
4. Soubory a metodika	45
4.1. Genetická část	49
4.2. Biochemická část	51
4.3. Statistické analýzy	53
5. Výsledky a diskuze	54
5.1. Detekce variant ve vybraných polymorfismech kandidátních genů pro AD u pacientů s DM2, GDM a u osob s PGT	54
5.1.1. Výsledky	54
5.1.2. Diskuze	54



5.1.3. Shrnutí	56
5.2. Detekce nových variant ve vybraných exonech kandidátních genů <i>APOE</i> , <i>BINI</i> , <i>CLU</i> , <i>CRI</i> u pacientů s AD	57
5.2.1. Výsledky	57
5.2.2. Diskuze	59
5.2.3. Shrnutí	60
5.3. Stanovení vybraných adipokinů, inkretinů, cytokinů a parametrů spojených s neurodegenerací u pacientů s AD a kontrolních seniorů	60
5.3.1. Výsledky	60
5.3.2. Diskuze	62
5.3.3. Shrnutí	66
5.4. Stanovení vybraných cirkulujících steroidních hormonů u pacientů s AD	67
5.4.1. Výsledky	68
5.4.2. Diskuze	68
5.4.3. Shrnutí	70
6. Závěr	71
7. Literatura	73
8. Internetové zdroje	92
Přílohy – tabulky	93
Přílohy – obrázky	100
Přílohy – publikace	102
Příloha 1	103
Příloha 2	108
Příloha 3	129
Přílohy – prezentace	138
Příloha 4	140
Příloha 5	143

Příloha 6	146
Příloha 7	148
Příloha 8	151
Příloha 9	153
Příloha 10	156
Příloha 11	157
Příloha 12	160
Příloha 13	162

## Seznam zkratek

AD	Alzheimerova nemoc (Alzheimer's disease)
AK	aminokyselina
AP-2	adaptorový protein 2
APOE	apolipoprotein E
APP	amyloidový prekurzorový protein
BACE1	beta-site APP cleaving enzyme 1
BAI	body adiposity index
BDNF	brain-derived neurotrophic factor
BIN1	bridging integrator 1
BMI	body mass index
CCR5	C-C chemokine receptor type 5
CLU	clusterin
CNS	centrální nervová soustava
CR1	complement receptor 1
CSF	cerebrospinální tekutina (cerebrospinal fluid)
CSFs	colony-stimulating faktory
DHEA	dehydroepiandrosteron
DM2	diabetes mellitus 2. typu
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
EOAD	časná forma Alzheimerovy nemoci (Early onset Alzheimer's disease)
GDM	gestační diabetes mellitus
GIP	gastric inhibitory polypeptide
GLP-1	glucagon-like peptid

GWAS	celogenomová asociační studie (genome-wide association study)
IDO1	indolamin-2,3-dioxygenáza
IFNs	interferony
IGF-1	insulin like growth factor 1
IL-10	interleukin 10
IL-6	interleukin 6
ILs	interleukiny
IR	inzulínová rezistence
LDL	nízkodenzitní lipoprotein (low density lipoprotein)
LOAD	pozdní forma Alzheimerovy nemoci (Late onset Alzheimer's disease)
NADPH	Nikotinamidadeninukleotidfosfát
NCPE ATP III	National Cholesterol Education Program Adult Treatment Part III
PDGF	platelet-derived growth factor
PGT	porušená glukózová tolerance
PICALM	phosphatidylinositol binding clathrin assembly protein
PSEN1	presenilin 1
PSEN2	presenilin 2
RANTES	regulated upon activation normal T cell expressed and secreted
sCD40L	soluble CD40 ligand
SHBG	sex hormone-binding globulin
SULT2A1	sulfotransferase family 2A, dehydroepiandrosterone-preferring, member 1
TNFs	tumor nekrotické faktory
TNF- $\alpha$	tumor necrosis factor $\alpha$

## 1. Úvod

V roce 1907 bylo poprvé popsáno onemocnění, které je dnes známé jako Alzheimerova nemoc (Alzheimer's disease, AD). Svůj název dostalo po německém neuropatologovi Aloisi Alzheimerovi, který jako první popsal výskyt „zvláštních nedobytných buněk“, která dnes známe pod názvem neurofibrilární klubka. Tento neuropatolog dále popsal formování plaků v superiorní vrstvě mozkové kůry. V době, kdy Alois Alzheimer toto onemocnění popsal, však již byla neurofibrilární klubka známá a byla spojována se stařeckou demencí. Vztah mezi tzv. senilními plakami a demencí byl také popsán o pár let dříve, nicméně Alois Alzheimer je považován za objevitele klinicko-patologických změn, která souvisejí s tímto onemocněním, a tedy i za objevitele Alzheimerovy nemoci (Ramirez-Bermudez, 2012).

AD je stále častěji se vyskytující neurodegenerativní onemocnění postihující převážně starší část české i světové populace. Jedná se o multifaktoriální onemocnění, na jehož vzniku a rozvoji se podílejí faktory genetické, biochemické i faktory vnějšího prostředí. Diagnostika AD je velmi problematická. Během života pacienta lze přítomnost AD předpokládat na základě rodinné anamnézy, fyzických, kognitivních a psychologických testů, díky vyšetření magnetickou rezonancí a vyšetření cerebrospinální tekutiny. S určitostí lze toto onemocnění diagnostikovat až po smrti pacienta histologickým vyšetřením mozkové tkáně.

Prevalence AD začíná být alarmující a neustále stoupá. Zpráva o stavu demence z roku 2016 uvádí, že v roce 2015 bylo v ČR skoro 156 tisíc osob s demencí a je odhadováno, že v roce 2020 stoupne tento počet na 183 tisíc a v roce 2050 na 383 tisíc (Mátl et al., 2016).

AD zatěžuje nejen samotného pacienta, ale i jeho okolí, na které bývá pacient velmi často zcela odkázán. Kromě fyzické a psychické zátěže se jedná i o zátěž ekonomickou. V roce 2008 byly v Evropě náklady spojené s léčbou AD vyšší než 177 bilionů euro (Wimo et al., 2011). Vlastní léčba AD by měla v ideálním případě zahrnovat farmakoterapii (kognitivních i nekognitivních poruch) i psychosociologickou terapii (trénink paměti, soběstačnosti atd.).

Z výše uvedeného vyplývá, že je potřeba co nejvíce podhalit pozadí AD, které by přispělo k včasější a přesnější diagnostice. Jakýkoliv nový genetický nebo biochemický

marker, který může souviset se vznikem a rozvojem AD je důležitý a spolu s již známými rizikovými faktory může přispět k lepší diagnostice tohoto onemocnění.

Tato práce vznikla v Endokrinologickém ústavu v Praze na Oddělení molekulární endokrinologie mezi lety 2014–2018 a navazuje na výzkumný projekt a diplomovou práci, která se tématem AD zabývala (VACÍNOVÁ, Gabriela. *Diabetes mellitus 2. typu a Alzheimerova demence: studium společných patogenetických faktorů*. Praha, 2014. Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze. Přírodovědecká fakulta. Katedra antropologie a genetiky člověka.).

## 2. Literární přehled

### 2.1. Epidemiologie Alzheimerovy nemoci

Prevalence AD (tj. počet jedinců s onemocněním v populaci) je velmi vysoká a neustále stoupá. Nárůst počtu pacientů s AD je dáván do souvislosti se stárnutím populace. V roce 2000 bylo na světě okolo 420 milionů osob starších 65 let. Podle odhadů stoupne tento počet v roce 2030 na 973 milionů. V rámci Evropy se počet osob starších 65 let zvýší z 16 % na 24 %, v rámci Severní Ameriky z 13 % na 20 % (The Centers for Disease Control and Prevention, 2003).

V roce 2001 bylo na světě přes 24 milionů osob starších 60 let s demencí, z toho 70 % byli pacienti s AD (Ferri et al., 2005). V roce 2015 se tento počet zvýšil na 46 milionů (www.alz.co.uk, 8. 9. 2018). Vzhledem k tomu, jak rychle počet pacientů narůstá, se odhaduje, že v roce 2030 se tento počet zdvojnásobí a v roce 2050 stoupne dokonce na 135 milionů.

Incidence AD (tj. počet jedinců v populaci, u kterých se toto onemocnění rozvine za určité časové období) roste úměrně s věkem. U žen se AD vyskytuje častěji než u mužů (Azad et al., 2007), což pravděpodobně souvisí s vyšší věkovou hranicí dožití u žen.

Zpráva o stavu demence z roku 2016 uvádí, že v České republice bylo v roce 2015 téměř 156 tisíc pacientů s AD. Tento počet je pouze předpokládaný, protože ne všichni pacienti jsou správně diagnostikováni. Dvě třetiny pacientů v České republice jsou ženy (Mátl et al., 2016).

### 2.2. Patofyziologie Alzheimerovy nemoci

Pro AD je typická tvorba tzv. senilních plaků, tvořených nadměrným ukládáním  $\beta$ -amyloidních peptidů v extracelulárním prostoru mozkové tkáně.  $\beta$ -amyloidní peptidy vznikají štěpením amyloidového prekurzorového proteinu (APP) a jsou složeny z 39-42 aminokyselin. Za fyziologických podmínek je APP štěpen enzymem  $\alpha$ -sekretázou na kratší fragmenty, které jsou rozpustné a pravděpodobně mohou působit neuroprotektivně (Morley and Farr, 2014) – tzv. non-amyloidní způsob štěpení APP. V případě patologie je APP štěpen pomocí enzymů  $\beta$ - a  $\gamma$ -sekretázy na fragmenty delší než 42 aminokyselin. Tyto formy jsou nerozpustné, tvoří shluky neurotoxických oligomerů a jsou typické pro AD – tzv. amyloidní hypotéza (Sorrentino et al., 2014). Nadprodukce  $\beta$ -amyloidních peptidů zhoršuje kognitivní funkce, způsobuje oxidativní poškození tkání,

vede k narušení hematoencefalické bariéry a k formování pro AD typických senilních plaků (Morley and Farr, 2014). Kromě toho dochází k narušení intracelulární homeostázy vápníku, ke zvýšení produkce volných radikálů díky ovlivnění mitochondriální redoxní aktivity i k prohloubení účinků jiných toxických látek (Sorrentino et al., 2014).

Dalším charakteristickým znakem AD je přítomnost tzv. intracelulárních neurofibrilárních klubek, která vznikají nadměrnou fosforylací tau proteinu (Pimplikar, 2009). Tau protein je protein asociovaný s mikrotubuly a je exprimován převážně v nervových buňkách. Za fyziologických podmínek hraje zásadní roli ve stabilizaci cytoskeletu neuronů. Za patologických podmínek dochází k hyperfosforylaci tau proteinu a k následné agregaci do párových helikálních filament, která vedou k tvorbě neurofibrilárních klubek (Martin et al., 2013). Hyperfosforylovaný tau protein spouští neurotoxické pochody, které mají vliv na fyziologickou strukturu neuronálního cytoskeletu. Přítomnost neurofibrilárních klubek tedy vede k poškození stavby neuronu, k následnému zhoršení komunikace s ostatními nervovými buňkami a k apoptóze (Maeda et al., 2007).

AD je někdy označována jako *diabetes mellitus 3. typu* (de la Monte and Wands, 2008). Důvodem je přítomnost inzulínové rezistence nervové tkáně (nebo mozku) u pacientů s AD. Na rozdíl od periferní inzulínové rezistence u pacientů s diabetem 2. typu se u AD jedná o inzulínovou rezistenci mozkové tkáně. Původně se předpokládalo, že mozek je orgán necitlivý k účinkům inzulínu. Později bylo zjištěno, že některé oblasti (čichová oblast, cerebrální kortex, hippocampus, hypothalamus, amygdala, mediální temporální kortex) obsahují receptory pro inzulín (Craft, 2009), a že inzulín prochází přes hematoencefalickou bariéru pomocí specifických přenašečů (Poduslo et al., 2001). Inzulín má v mozkové tkáni zachovanou funkci růstového faktoru včetně vlivu na synaptogenezi a růst nervových buněk. V případě nefunkčnosti inzulínových receptorů dochází k inzulínové rezistenci mozkové tkáně a k následnému zhoršení kognitivních funkcí spojených s AD (Craft and Watson, 2004).

### **2.3. Genetika Alzheimerovy nemoci**

AD je heterogenní onemocnění, které se z hlediska nástupu klinických příznaků rozděluje do dvou skupin. Zhruba v 5 % případů se AD manifestuje okolo 40. nebo 50. roku života a ve většině případů se jedná o časnou familiární formu AD (*early onset AD*). U 95 % případů se AD začne manifestovat až po 65. roce života, jedná se o tzv. pozdní formu AD (*late onset AD*). Z klinického hlediska jsou obě tyto formy těžko rozlišitelné. Časná



forma AD je však mnohem závažnější, protože je asociována s rychlejší progresí onemocnění. Na rozdíl od klinického je genetické pozadí jednotlivých forem AD odlišné (Reitz et al., 2011).

### 2.3.1. Časná forma Alzheimerovy nemoci

Časná forma AD se většinou dědí klasickým mendelovským způsobem, nicméně může vzniknout i sporadicky. U této časně formy AD se uplatňují tři geny: *amyloidový prekurzorový protein (APP)*, *presenilin 1 (PSEN1)* a *presenilin 2 (PSEN2)*. Mutace v těchto genech vedou ke zvýšené produkci  $\beta$ -amyloidních peptidů a k následné apoptóze neuronů a rozvoji demence (Tanzi, 2012).

*APP* je gen lokalizovaný na 21. chromozomu. Díky tomu může být jedním z rizikových faktorů pro rozvoj AD i Downův syndrom. Díky trisomii 21. chromozomu může docházet ke zvýšené expresi APP a k následné akumulaci  $\beta$ -amyloidu (Bagyinszky et al., 2014). Je známo více jak 30 mutací v *APP* genu, z toho ~ 25 je klasifikováno jako patogenní a ve většině případů vedou k autozomálně dominantně děděné časně formě AD (Alonso-Vilatela et al., 2012).

Struktura genů *PSEN1* a *PSEN2* je velmi podobná, geny jsou homologní v 67 %. Oba geny obsahují 12 exonů, z toho proteiny PS1 a PS2 jsou kódovány 3-12 exonem. *PSEN1* gen je lokalizován na 14. chromozomu. Ve spojitosti s časnou formou AD bylo nalezeno přes 180 mutací, které mohou být zapojeny i do patologie pozdní formy AD (Cruts et al., 2012). Z klinického hlediska se mutace v *PSEN1* genu projevují progresivní demencí a parkinsonismem, nicméně je zde značná variabilita mezi jednotlivými pacienty. Mohou se objevit poruchy řeči, zhoršená chůze i změna reflexů (Alonso-Vilatela et al., 2012).

*PSEN 2* gen se nachází na 1. chromozomu. Mutace v tomto genu jsou vzácnější příčinou časně formy AD a většinou mívají nižší penetranci než mutace v genu *PSEN1* (Alonso-Vilatela et al., 2012). Klinické projevy bývají různorodé a často atypické (Binetti et al., 2003).

### 2.3.2. Pozdní forma Alzheimerovy nemoci

Genetické pozadí pozdní formy AD je mnohem komplexnější. Za vznik této formy je zodpovědná řada genů (polygenní onemocnění), jejich vzájemné interakce (gen-gen) i interakce genů s prostředím (gen-prostředí). Většina případů pozdní formy AD vzniká sporadicky bez nutného zatížení v rodinné anamnéze (Alonso-Vilatela et al., 2012).

Nicméně riziko vzniku AD stoupá u jedinců s přímými postiženými příbuznými. Z celogenomových asociačních studií (genome-wide association study GWAS) vzešla řada kandidátních genů pro AD. Tyto studie porovnávají relativní zastoupení jednotlivých variant genu mezi pacienty a kontrolní skupinou. V případě nalezené asociace lze předpokládat, že gen s danou nemocí souvisí. Tato práce se zaměřila na vybrané kandidátní geny – *APOE*, *BINI*, *CLU*, *CRI* a *PICALM*.

### **Gen pro Apolipoprotein E**

Nejvýznamnějším a dosud jediným známým rizikovým genem souvisejícím s pozdní formou AD je gen pro *Apolipoprotein E* (*APOE*). *APOE* se nachází na 19. chromozomu a obsahuje 4 kódující oblasti. Protein *APOE* je složený z 229 aminokyselin a je exprimován v mnoha orgánech. V mozkové tkáni je produkován převážně astrocyty, o něco méně mikrogliovými buňkami a za určitých podmínek i neurony (Kim et al., 2009). *APOE* je hlavním transportérem cholesterolu v mozkové tkáni, který je důležitý pro ochranu a případnou opravu nervových buněk. Váže se na příslušné receptory na povrchu buněk, které se účastní přenosu lipidů, glukózového metabolismu, neuronální signalizace a mitochondriální aktivity. Za fyziologických podmínek se *APOE* váže na  $\beta$ -amyloidní peptidy a zabraňuje jejich hromadění (Bu, 2009).

V *APOE* genu byly popsány dva polymorfismy lokalizované v kodonu 130 a 176 (podle transkriptu NM\_000041.3). V závislosti na přítomnosti alely ( $\epsilon$ 2,  $\epsilon$ 3 nebo  $\epsilon$ 4) byly identifikovány tři možné varianty tohoto genu – *APOE*2, *APOE*3 a *APOE*4. Jednotlivé varianty se liší podle přítomných aminokyselin v daných lokusech. Varianta *APOE*3, která je definována jako nejběžnější varianta, má v pozici 130 cystein a v pozici 176 arginin. Varianta *APOE*2 má v obou pozicích cystein, varianta *APOE*4 má v obou pozicích arginin. Vzhledem k tomu, že každý jedinec má v daném lokusu dvě alely (od otce a od matky), může vzniknout 6 možných genotypů (Tab.1).

Tab. 1 Varianty v genu *APOE*

Alely	Přítomná aminokyselina	
	kodon 130	kodon 176
$\epsilon 2/\epsilon 2$	Cys	Cys
$\epsilon 2/\epsilon 3$	Cys	Cys, Arg
$\epsilon 2/\epsilon 4$	Cys, Arg	Cys, Arg
$\epsilon 3/\epsilon 3$	Cys	Arg
$\epsilon 3/\epsilon 4$	Cys, Arg	Arg
$\epsilon 4/\epsilon 4$	Arg	Arg

Alela  $\epsilon 4$  je riziková pro vznik a rozvoj AD. Její patogenní povaha může být asociována se strukturními změnami APOE proteinu. APOE protein má dvě hlavní funkční domény – N-terminální doménu velkou 22 kDa a C-terminální doménu velkou 10 kDa. Alela  $\epsilon 4$  může podporovat interakce mezi těmito doménami díky změně orientace Arg61 v N-doméně. Arg 112 (podle transkriptu NM\_000041.3 Arg 130) poté interaguje s Glu255 v C-terminální doméně, což vede ke strukturním změnám APOE proteinu, apoptóze nervových buněk a k následné neurodegeneraci (Bagyinszky et al., 2014).

Frekvence jednotlivých alel v populaci se liší v závislosti na jednotlivých studiích s rozmezím 6,7-10 % pro  $\epsilon 2$ , 75-82,8 % pro  $\epsilon 3$  a 7,5-15,6 % pro  $\epsilon 4$  (McKay et al., 2011). U pacientů s pozdní formou AD se alela  $\epsilon 4$  vyskytuje v 50 % případů ve srovnání s kontrolní skupinou, kde se vyskytuje s frekvencí 20-25 %. Nositelé jedné alely  $\epsilon 4$  mají 3x vyšší riziko rozvoje AD, homozygoti pro alelu  $\epsilon 4$  mají riziko zvýšené až 12x (Alonso-Vilatela et al., 2012). Samotná přítomnost rizikové alely  $\epsilon 4$  však pro rozvoj AD nestačí, pouze zvyšuje pravděpodobnost rozvoje tohoto onemocnění. Samotné vyšetření genu pro *APOE* proto nelze použít pro diagnostiku AD.

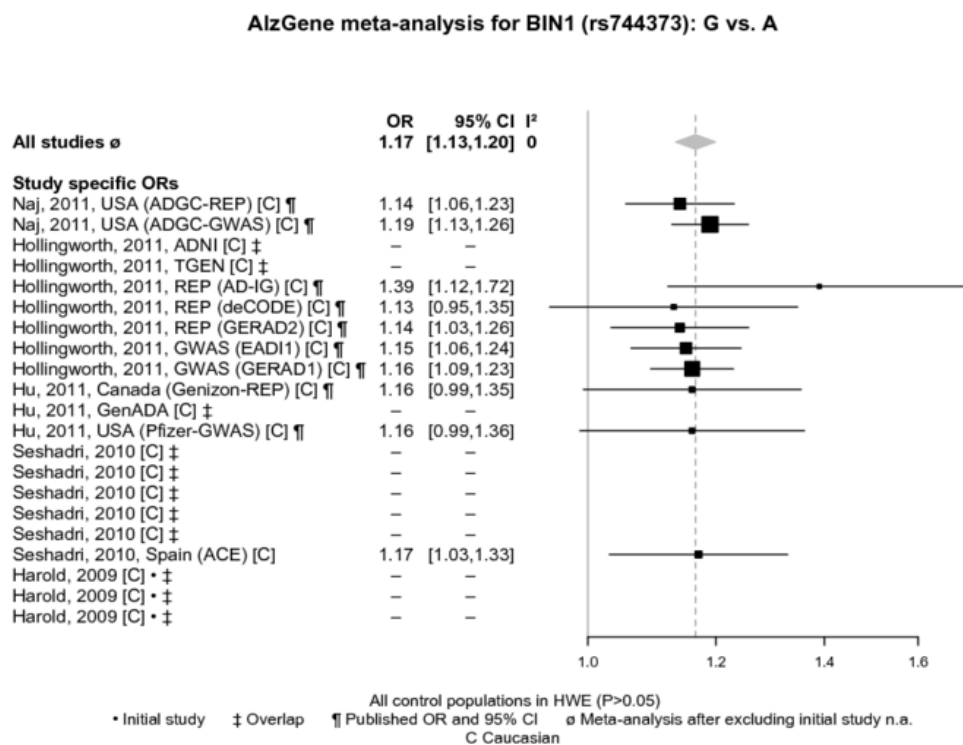
### **Gen pro Bridging Integrator 1**

*Bridging Integrator 1 (BIN1)* je tumor supresorový gen lokalizovaný na 2. chromozomu. Protein BIN1 je exprimován především v kosterním svalstvu a mozkové tkáni. BIN1 je klíčovým regulátorem buněčné endocytózy, regulace cytoskeletu, účastní se oprav DNA, progresu buněčného cyklu i buněčné apoptózy. Modifikace tohoto proteinu jsou dávány do souvislosti s progresí rakoviny, některými druhy myopatií, srdečním selháním a s pozdní formou AD (Prokic et al., 2014).

Studie prováděné na hád'átku obecném ukázaly, že BIN1 hraje roli v navádění APP, APOE a  $\beta$ -amyloidních peptidů během endolysosomálního procesu (Hu et al., 2011). Díky

schopnosti regulovat cytoskelet může BIN1 také interagovat s mikrotubuly tau proteinu (Chapuis et al., 2013). V rámci regulace endocytózy je BIN1 důležitý pro intracelulární navádění velkých molekul zahrnujících proteiny a lipidy. V souvislosti se zánětem se BIN1 podílí na fagocytóze makrofágy. Má schopnost regulovat expresi indolamin-2,3-dioxygenázy, což je enzym důležitý v obranném mechanismu proti patogenům a parazitům. Exprese tohoto enzymu byla prokázána v amyloidových placích a neurofibrilárních klubkách v mozkové tkáni AD (Tan et al., 2013).

Podle celogenomových asociačních studií a genových databází je *BINI* po *APOE* druhým nejdůležitějším rizikovým genem účastnícím se patologie AD. Výsledky těchto studií, konkrétně výsledky pro polymorfismus rs744373, shrnuje Obr. 1.



Obr. 1 Výsledky celogenomových asociačních studií pro polymorfismus rs744373 v genu *BINI* (<http://www.alzgene.org/meta.asp?geneID=708>)

### **Gen pro Clusterin**

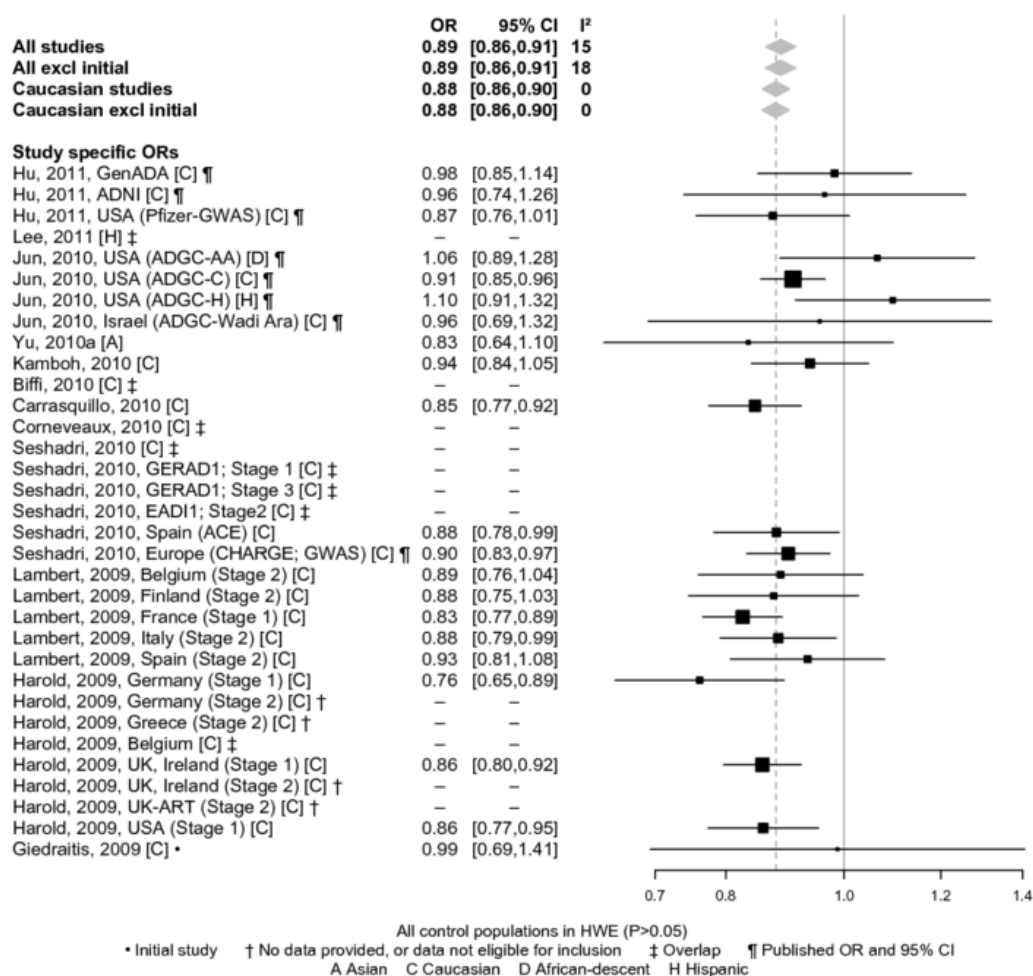
*Clusterin (CLU)* je další rizikový gen asociovaný s pozdní formou AD. *CLU* se nachází na 8. chromozomu a obsahuje 9 exonů. Lidský gen *CLU* se může vyskytovat

ve třech různých transkripčních izoformách. Každý z těchto transkriptů má unikátní fragment prvního exonu a zbylé exony 2–9 mají shodné (Yu and Tan, 2012).

Produkt tohoto genu, lipoprotein CLU, je exprimovaný převážně v mozkové tkáni, ale také v ováriích, varlatech a játrech. Účastní se mnoha fyziologických procesů, jako jsou změny v synaptických spojích, apoptóza, recyklace membrán během vývoje nebo v odpovědi na poranění (Guerreiro et al., 2010). CLU interaguje s lipidy, amyloidovými proteiny a imunoglobuliny (Jones and Jomary, 2002). Je jedním z proteinů nalézáných v amyloidních placích. CLU váže rozpustný  $\beta$ -amyloidní peptid v cerebrospinální tekutině a formuje ho tak, aby byl schopný procházet přes hematoencefalickou bariéru (Zlokovic, 1996).

U pacientů s AD byly nalezeny zvýšené hladiny CLU v mozku a v cerebrospinální tekutině. Podle studií koncentrace CLU v periférii pravděpodobně odráží koncentraci tohoto proteinu v centrální nervové soustavě. Díky tomu jsou hladiny plazmatického CLU dávány do asociace s atrofií mozkové tkáně, progresí AD a s mírou závažnosti tohoto onemocnění (Thambisetty et al., 2010). Výsledky GWAS zaměřených na gen *CLU*, které ukazují asociaci polymorfismu rs11136000 s AD, shrnuje Obr. 2.

### AlzGene meta-analysis for CLU (rs11136000): A vs. G



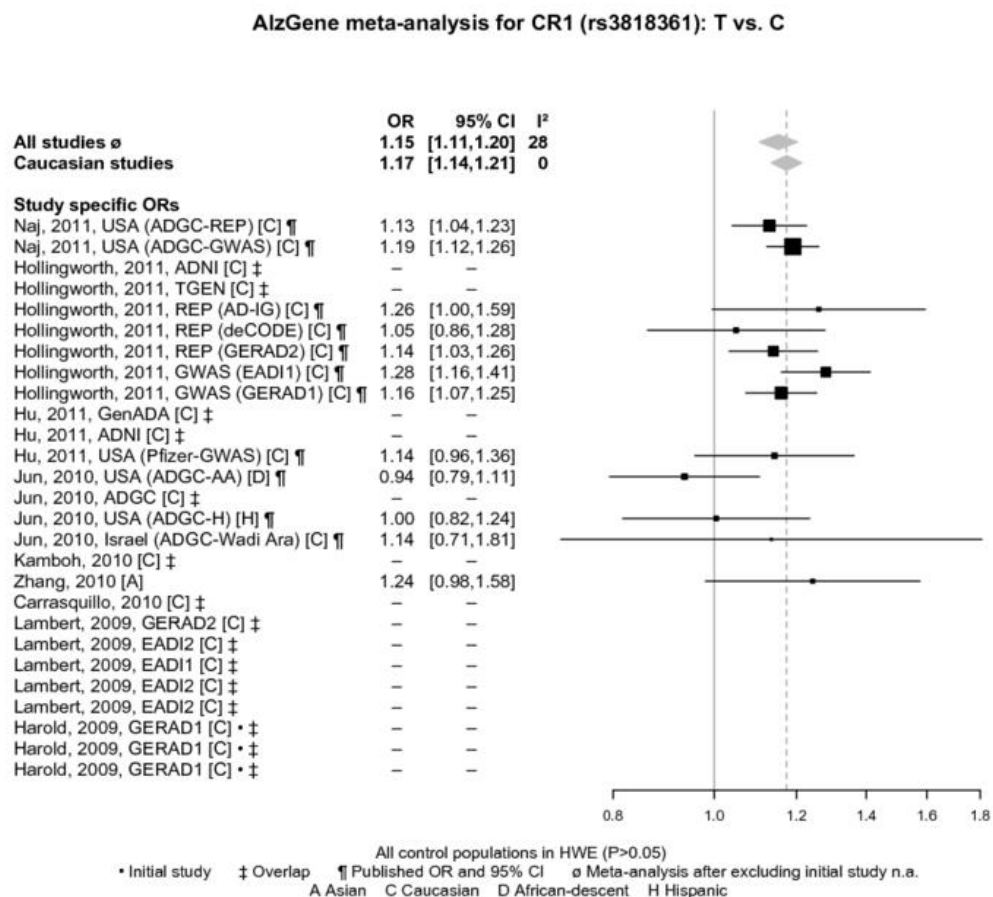
Obr. 2 Výsledky celogenomových asociačních studií pro polymorfismus rs11136000 v genu *CLU* (<http://www.alzgene.org/meta.asp?geneID=323>)

### Gen pro Complement Receptor 1

*Complement receptor 1 (CRI)* je gen nacházející se na dlouhém raménku 1. chromozomu. Kóduje transmembránový glykoprotein CR1, který hraje významnou roli v adaptivní imunitní odpovědi. Tento protein patří do skupiny negativních regulátorů aktivace komplementu (*regulators of complement activation*), kde inhibuje klasické i alternativní dráhy tohoto procesu (Karch et al., 2012). CR1 je nejčastěji exprimován v erytrocytech, kde zprostředkovává vazbu buněk na částice a imunitní komplex, a je zapojen do imunologické likvidace patogenů na povrchu těchto buněk (Li et al., 2010a).

Někteří autoři uvádí, že za formování AD nemůže stupeň akumulace  $\beta$ -amyloidního peptidu, ale jak moc je tento peptid odstraňován (Mawuenyega et al., 2010). Za fyziologických podmínek je „buněčný odpad“ odstraňován pomocí mikroglíí, které se na tomto procesu aktivně podílejí a tím podporují regeneraci a opravu poškozených nebo odumřelých buněk ve svém okolí (Fetler et al., 2005). Bylo zaznamenáno, že CR1 je přítomen na povrchu těchto mikroglíí, kde je zapojen do odstraňování  $\beta$ -amyloidu (Crehan et al., 2013).

CR1 dále hraje roli v neurozánětu. Jak bylo zmíněno výše, CR1 může regulovat kaskádu komplementu na více úrovních. Systém komplementu je klíčový iniciátor zánětu (Song et al., 2000), a může tedy být obzvláště důležitý v patologii AD. CR1 byl dáván i do souvislosti s tau proteinem, nicméně jsou třeba ještě další studie, které by toto spojení více objasnily. Výsledky GWAS pro gen CR1 a asociaci polymorfismu rs3818361 s AD shrnuje Obr. 3.



Obr. 3 Výsledky celogenomových asociačních studií pro polymorfismus rs3818361 v genu *CR1* (<http://www.alzgene.org/meta.asp?geneID=635>)

### **Gen pro Phosphatidylinositol binding clathrin assembly protein**

*PICALM*, dříve označován jako *clathrin assembly lymphoid myeloid leukemia* (*CALM*), je dalším rizikovým genem pro AD vzešlým z celogenomových asociačních studií. *PICALM* je lokalizovaný na dlouhém raménku 11. chromozomu. Produkt tohoto genu, phosphatidylinositol binding clathrin assembly protein (*PICALM*), je exprimován v mnoha tkáních a buňkách. V centrální nervové soustavě se *PICALM* nachází v neuronech, astrocytech, oligodendrocytech (Tebar et al., 1999; Yao et al., 2003), ale i v endoteliálních buňkách mozkové tkáně (Baig et al., 2010).

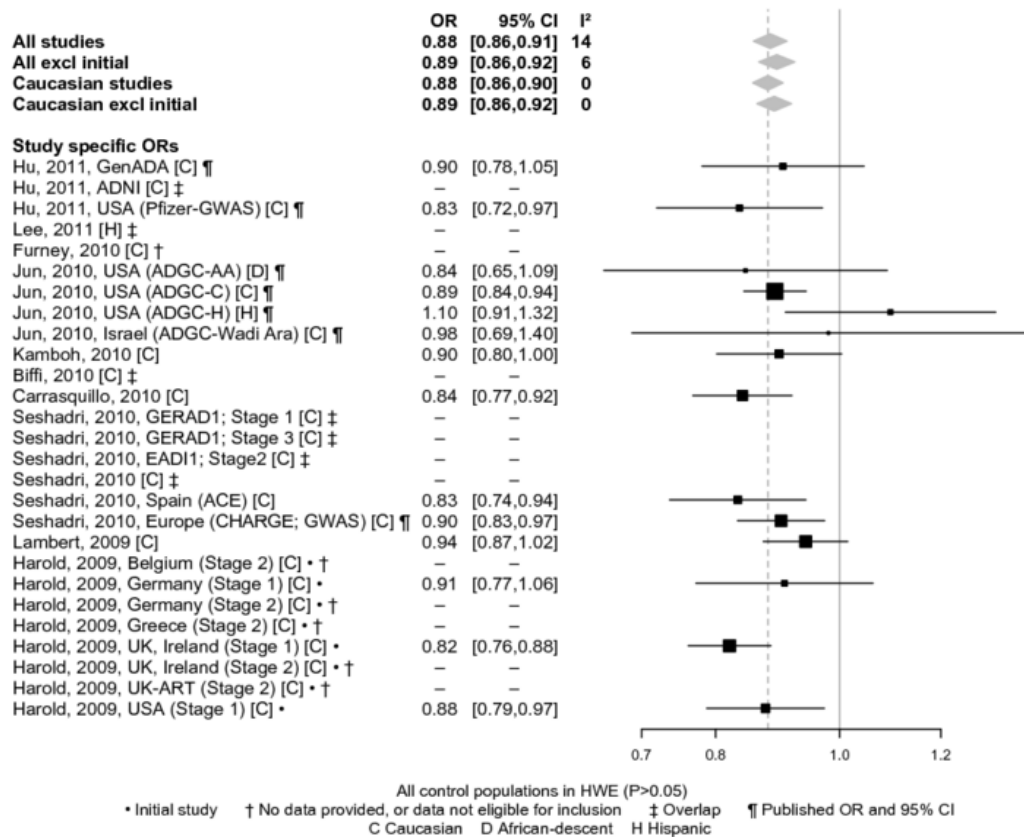
*PICALM* se účastní metabolismu cholesterolu a homeostáze lipidů. Defekty v tomto proteinu vedou k odlišné expresi genů zapojených do biosyntézy cholesterolu a jeho nefunkčnost přispívá ke zvýšené expresi LDL receptorů na povrchu buněk a ke zvýšení množství celkového cholesterolu (Mercer et al., 2015).

*PICALM* má dále potenciální úlohu v růstu, krvetvorbě a metabolismu železa (Klebig et al., 2003). Hraje klíčovou úlohu v endocytóze zprostředkované clathrinem, která je důležitá pro regulaci receptorů, synaptický přenos a pro odstraňování buněk po apoptóze. *PICALM* „verbuje“ clathrin a adaptorový protein 2 (AP-2) na plazmatickou membránu kde společně s AP-2 rozpoznává cílové proteiny. Přítomnost clathrinu způsobuje deformaci membrány v okolí cílových proteinů, obaluje je do váčků pokrytých clathrinem a dochází ke zpracování v lysozomech (místo pro degradaci cílových proteinů) nebo v endozomech (proteiny jsou zde modifikovány nebo recyklovány a vráceny zpět na plazmatickou membránu) (Wu et al., 2009). Nadměrná exprese, ale i degradace proteinu *PICALM*, vede k narušení této endocytické dráhy (Baig et al., 2010).

U pacientů s AD byla nalezena zvýšená exprese genu *PICALM* v oblasti frontálního kortexu. Studie uvádí, že je to možná odpověď na zvýšené hladiny  $\beta$ -amyloidních peptidů. Autoři se domnívají, že specifita jednotlivých regionů mozku a biochemické změny související s hyperfosforylací tau proteinu mohou upravovat vliv  $\beta$ -amyloidních peptidů na expresi genu *PICALM* (Baig et al., 2010). Asociace mezi genem *PICALM* a rizikem pro rozvoj AD byla prokázána v mnoha studiích (Harold et al., 2009; Carrasquillo et al., 2010; Kamboh et al., 2010). Na druhou stranu, některé studie žádnou významnou asociaci nenašly (Li et al., 2008; Jun et al., 2010). Výsledky GWAS pro gen *PICALM*, konkrétně pro polymorfismus rs3851179, shrnuje Obr. 4.



AlzGene meta-analysis for PICALM (rs3851179): A vs. G



Obr 4 Výsledky celogenomových asociačních studií pro polymorfismus rs3851179 v genu *PICALM* (<http://www.alzgene.org/meta.asp?geneID=636>)

## 2.4. Biochemické pozadí Alzheimerovy nemoci

S přibývajícím věkem roste riziko vzniku metabolických onemocnění, mezi která patří např. diabetes 2. typu, hyperlipoproteinemie nebo dna. Tato onemocnění vznikají důsledkem poruchy tvorby, ukládání, látkové přeměny nebo vylučování určitých látek v organismu, které jsou u zdravých jedinců v rovnováze. V případě přítomnosti alespoň tří následujících poruch – vysoký krevní tlak, vysoká hladina HDL cholesterolu, vysoká hladina triacylglycerolů, porušená glukózová tolerance, obezita – mluvíme o přítomnosti metabolického syndromu (podle NCEP ATP III, revize 2005). Prevalence metabolického syndromu, stejně jako jiných metabolických onemocnění, roste úměrně s přibývajícím věkem. Dostupná data ukazují, že metabolickým syndromem trpí zhruba 7 % osob ve věku 20 let, zatímco u osob starších 60 let se metabolický syndrom vyskytuje ve 42 % (Ford et al., 2002).

Metabolické poruchy mohou souviset se změnami některých parametrů, mezi které patří adipokiny, cytokiny nebo steroidní látky. Vzhledem k tomu, že velká část pacientů s AD má zároveň i některou z výše uvedených poruch tvořící metabolický syndrom, by tyto parametry mohly souviset i s AD. Tato práce se zaměřila na vybrané adipokiny, cytokiny, biomarkery spojené s neurodegenerací a steroidní hormony, které jsou popsány v následujících odděleních.

#### **2.4.1. Alzheimerova nemoc a adipokiny**

Adipokiny jsou proteiny produkované tukovou tkání. Jedná se o pleiotropní molekuly, které přispívají k zánětlivému stavu u obézních jedinců. Díky tomu mohou vzniknout různé metabolické poruchy včetně autoimunitních a zánětlivých onemocnění (Abella et al., 2014).

Adipokiny mají autokrinní, parakrinní i endokrinní mechanismy účinku a mnoho z nich ovlivňuje procesy jak v periférii, tak v centrální nervové soustavě. Adipokiny procházejí přes hematoencefalickou bariéru, působí v hypotalamu, kde pomáhají regulovat rovnováhu mezi pocitem sytosti a hladu. Hrají klíčovou úlohu v regulaci energetického metabolismu. Mimo jiné mají i specifickou úlohu v imunitní odpovědi, inzulínové senzitivitě, lipidovém a glukózovém metabolismu a v zánětu (Kiliaan et al., 2014).

Neurodegenerativní a vaskulární procesy, které při rozvoji demence můžeme pozorovat, ovlivňují různé oblasti mozkové tkáně (Wenk, 2003). Během těchto procesů může pravděpodobně dojít ke změně působení adipokinů, které mohou následnou zpětnou vazbou samy přispět k neurodegeneraci (Kiliaan et al., 2014).

Asociace mezi vybranými adipokiny a AD jsou podrobněji popsány v našem přehledovém článku:

Gabriela Vacínová, Markéta Vaňková. Adipokiny a jejich úloha v patologii Alzheimerovy nemoci. *DMEV*. (2016), 3:125-130.

# ADIPOKINY A JEJICH ÚLOHA V PATOLOGII ALZHEIMEROVY NEMOCI

## ADIPOKINES AND THEIR ROLE IN THE PATHOLOGY OF ALZHEIMER'S DISEASE

GABRIELA VACÍNOVÁ<sup>1,2</sup>, MARKÉTA VAŇKOVÁ<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Endokrinologický ústav, Praha

<sup>2</sup>Katedra antropologie a genetiky člověka UK, Praha

### SOUHRN

Alzheimerova nemoc je progresivní neurodegenerativní onemocnění charakterizované ukládáním  $\beta$ -amyloidu a hyperfosforylací  $\tau$ -proteinu v postiženém mozku. Jedná se o multifaktoriální onemocnění, na jehož patologii se podílejí jak faktory genetické, tak faktory vnějšího prostředí. Kromě genetického pozadí Alzheimerovy nemoci se stále častěji diskutuje o pozadí biochemickém.

Mezi jedny z biochemických markerů, které mohou ovlivňovat Alzheimerovu nemoc, patří adipokiny. Adipokiny jsou bílkoviny produkované tukovou tkání, které po vyplavení do krevního řečiště ovlivňují řadu procesů. Vliv adipokinů na rozvoj Alzheimerovy nemoci je patrný, avšak ne zcela jednoznačný. Tento přehled popisuje roli vybraných adipokinů při vzniku a rozvoji Alzheimerovy nemoci.

**Klíčová slova:** adipokiny, Alzheimerova nemoc, tuková tkáň, zánět

### SUMMARY

Alzheimer's disease is a progressive neurodegenerative disorder characterized by the deposition of  $\beta$ -amyloid and hyperphosphorylation of  $\tau$ -protein in a brain. The pathology of this multifactorial disease is influenced by genetic as well as environmental factors. In addition to the genetic background of Alzheimer's disease, there are increasingly discussed biochemical background. Among some of the biochemical markers that can affect the Alzheimer's disease are adipokines. Adipokines are proteins secreted by adipose tissue, which after flooding to the bloodstream affect a variety of processes. The influence of adipokines in development of Alzheimer's disease is evident, however not entirely clear. This review describes the role of selected adipokines in the creation and development of Alzheimer's disease.

**Key words:** adipokines, Alzheimer's disease, adipose tissue, inflammation

### Úvod

Alzheimerova nemoc (AD) je heterogenní multifaktoriální onemocnění, na jehož patologii se podílejí faktory genetické i faktory vnějšího prostředí. Jedná se o progresivní neurodegenerativní onemocnění charakterizované patologickým ukládáním  $\beta$ -amyloidních peptidů v mozku.  $\beta$ -amyloid vzniká z amyloidového prekurzorového proteinu, který je fyziologickou součástí buněčné membrány. Nadměrné shlukování  $\beta$ -amyloidních peptidů v extracelulárním prostoru a jejich nedostatečné odbourávání vede k tvorbě tzv. senilních plaků.  $\beta$ -amyloidní peptidy jsou toxické pro nervové buňky a způsobují jejich smrt. AD je také charakterizována nadměrnou fosforylací  $\tau$ -proteinu.  $\tau$ -protein je běžnou složkou cytoskeletu nervových buněk. Nadměrná fosforylace  $\tau$ -proteinu vede k poškození stavby mikrotubulů neuronů, narušuje axonální transport a způsobuje nefunkčnost nervových buněk. Hyperfosforylovaný  $\tau$ -protein se u pacientů s AD shlukuje do tzv. neurofibrilárních klubek. AD patří mezi nejčastější typ demence. Postihuje především populaci starší

65 let. Česká alzheimerovská společnost uvádí, že v České republice je více než 143 tisíc pacientů s AD ([www.alzheimer.cz](http://www.alzheimer.cz), 22. 10. 2015) a tento počet neustále stoupá. Evropská asociace EPAD (European prevention of Alzheimer's dementia consortium) odhaduje, že do roku 2050 bude na světě více než 100 milionů osob s AD (<http://www.imi.europa.eu/content/epad>, 3. 11. 2015).

Zhoršená inzulinová signalizace a inzulinová rezistence mozkových buněk je charakteristickým patogenetickým znakem pro AD. Inzulinová rezistence periferních tkání je klíčová pro vznik diabetes mellitus 2. typu. Pro řadu společných patogenetických rysů bývá AD někdy označována jako „diabetes 3. typu“ (Stárka, 2009).

AD je v poslední době spojována i s některými hormony vylučovanými tukovou tkání – adipokiny. Adipokiny jsou bílkoviny, které se aktivně účastní metabolických procesů v organismu. Tyto hormony snadno přecházejí z krve do mozkové tkáně přes hematoencefalickou bariéru. Cílem jejich působení je hypothalamus, kde se účastní regulace rovnováhy mezi pocitem sytosti a hladu. Adipokiny mají klíčovou

úlohu v regulaci energetického metabolismu, hrají specifickou roli v imunitní odpovědi, inzulinové senzitivitě, hyperenzii, zánětu, glukózovém a lipidovém metabolismu a v dalších biologických procesech. Tyto látky mají velký potenciál v léčbě obezity, metabolických poruch nebo kardiovaskulárních onemocnění. Mohou být využity jako biomarkery poukazující na progresi onemocnění a následně pro úspěšnou individuální léčbu. Mezi často studované adipokiny patří: leptin, adiponektin, adiposin, resistin a visfatin. Dysregulace adipokinů je popsána u řady metabolických onemocnění, nicméně nezanedbatelnou roli by mohla mít i u neurodegenerativních onemocnění, včetně AD. Jak velkou měrou se adipokiny podílejí na vzniku a progresi AD, však není zatím zcela zřejmé.

#### LEPTIN

V roce 1994 byl objeven adipokin leptin (Zhang et al., 1994). Leptin je hormon tvořený 167 aminokyselinami, který hraje klíčovou úlohu v regulaci tělesné hmotnosti. Je důležitým regulátorem mezi příjmem a výdejem energie, slouží jako velmi citlivý marker obsahu tělesného tuku a metabolické aktivity (Haluzik et al., 1999a, b; Havel 2002). Je produkován tukovými buňkami, v menší míře i tkáň žiludku, kosterním svalstvem, játry nebo placentou (Barrata, 2002). Kromě ovlivňování příjmu potravy leptin stimuluje proliferaci buněk pankreatu, reguluje hladinu růstového hormonu, imunologickou rovnováhu, krvetvorbu a funkci gastrointestinálního traktu (Fantuzzi a Faggioni, 2000). Leptin ovlivňuje i vyšší nervové funkce, jako jsou procesy učení a paměti, a má vliv na synaptickou plasticitu hippocampu (Oomura et al., 2006).

Množství leptinu je závislé na množství tukové tkáně a hodnotě BMI. Jedinci s centrální obezitou mají nižší hladiny leptinu, protože viscerální tuková tkáň produkuje významně méně leptinu než podkožní tuková tkáň (Polák et al., 2006). V noci jsou hladiny leptinu o 30–100% vyšší než hodnoty naměřené ráno nebo brzy odpoledne. Během jídla dochází k přechodnému zvýšení hladin leptinu, zatímco k poklesu dochází během hladovění (Al-Suhaimi et al., 2013). Dříve se uvažovalo o možnostech využití leptinu v léčbě obezity. Obézním pacientům byl podáván leptin, aby došlo ke snížení obsahu tuku v těle (Farooqi et al., 2002). Později se zjistilo, že se u obézních jedinců časem vyvíjí rezistence k účinkům podávaného leptinu. Leptin se dnes k léčbě běžné obezity nepoužívá.

Hladiny cirkulujícího leptinu souvisí i s AD. Pacienti s AD mají snížené hladiny leptinu oproti zdravým jedincům. Studie *in vivo* i *in vitro* ukázaly, že leptin redukuje produkci  $\beta$ -amyloidu (Fewlass et al., 2004). Tato redukce je patrně způsobena díky lipolytické aktivitě leptinu, která mění složení lipidových přenašečů na membráně. Tento proces vede k omezení aktivity  $\beta$ -sekretázy, která štěpí amyloidový prekursorový protein. V konečném důsledku dochází ke snížené produkci  $\beta$ -amyloidu v mozkových buňkách (Fewlass et al., 2004).

Studie *in vitro* ukázaly, že leptin také redukuje nadměrnou fosforylaci  $\tau$ -proteinu (Greco et al., 2008) a je zapojen do regulace fungování hlavních kináz, které se na fosforylaci podílejí. Mezi tyto kinázy patří AMP aktivovaná proteinkináza (AMPK), p38 MAP kináza a proteinkináza B (Greco et al.,

2009). Leptin aktivuje AMPK, jež má vliv na fosforylaci  $\tau$ -proteinu i na vylučování  $\beta$ -amyloidu. Signální dráhy leptinu ukazují rozdílnou odpověď AMPK, která je tkáňově a neuronově specifická (Park et al., 2005). Bylo například prokázáno, že leptin aktivuje AMPK v kosterním svalstvu, ale naopak v hypotalamu ji inhibuje (Minokoshi et al., 2002). U nervových buněk v hippocampu může leptin působit i nezávisle na AMPK, a to prostřednictvím fosfatidylinositol-3-kinázy (Harvey, 2007). Hladiny leptinu v séru negativně korelují se stupněm poškození způsobeného AD (Khemka et al., 2014).

Dodávání leptinu myším se zvýšenou expresí  $\beta$ -amyloidu zlepšilo jejich kognitivní funkce (Tezapsidis et al., 2009). U pacientů s AD však jednoznačné výsledky prokázány nebyly. Některé studie ukázaly protektivní efekt vyšších hladin leptinu na kognitivní funkce (Holden et al., 2009), jiné žádnou souvislost neprokázaly (Warren et al., 2012).

#### ADIPONEKTIN

Adiponektin je adipokin, který byl objeven v roce 1995, tedy krátce po objevení leptinu (Scherer et al., 1995). Je to protein složený z 247 aminokyselin, který může zaujímat různé konformace. Koncentrace adiponektinu v plazmě je vysoká – tvoří asi 0,01% z celkového množství plazmatických proteinů (Blüher et al., 2015).

Hladiny adiponektinu závisí na distribuci tělesného tuku, která bývá ovlivněna pohlavními hormony. Ženy mají významně vyšší hladiny adiponektinu než muži (Staiger et al., 2003). U obézních jedinců jsou hladiny adiponektinu nižší než u štíhlých jedinců. Syntéza a sekrece tohoto adipokinu je snížena v případě nadbytku kalorií. Obecně se uvádí, že s narůstající mírou obezity se hladiny adiponektinu snižují (Ryan et al., 2003), ačkoliv některé studie významnou asociaci mezi hodnotou BMI a hladinami adiponektinu nenašly (Skurk et al., 2002).

Adiponektin vzbudil velký zájem díky potenciaci senzitivity k inzulinu a svými protizánětlivými a protidiabetickými účinky na řadu buněk (Turer et al., 2012). Adiponektin reguluje metabolismus triacylglycerolů, snižuje syntézu lipidů a produkci glukózy v játrech. Pozitivně asociuje s hladinami HDL-cholesterolu, pravděpodobně díky schopnosti aktivovat lipoproteinovou lipázu (Tschritter et al., 2003). Způsobuje pokles hladiny glukózy a volných mastných kyselin v krvi. Po aplikaci adiponektinu neobézním myším s diabetem 2. typu došlo k poklesu koncentrace glukózy v krvi (Berg et al., 2002). Adiponektin zvyšuje citlivost jaterní tkáně na inzulin a tuto citlivost může zvyšovat buď přímo, nebo nepřímo snížením koncentrace lipidů (Meier et al., 2004). U pacientů s diabetem 2. typu byla popsána nižší hladina cirkulujícího adiponektinu oproti zdravým jedincům (Spranger et al., 2003). Navzdory příznivým účinkům vyšších hladin adiponektinu na inzulinovou signalizaci a diabetes 2. typu bylo zvýšené množství tohoto adipokinu dáno do souvislosti s vyšším rizikem úmrtí u pacientů s kardiovaskulárními onemocněními (Wu et al., 2014).

Receptory pro adiponektin (AdipoR1 a AdipoR2) jsou rozšířeny i v CNS – v mozkových cévách, hippocampu, hypotalamu i v mozkovém kmeni. Aktivace těchto receptorů stimuluje fosforylaci acetyl-koenzymu-A-karboxylázy a zvyšuje množství AMPK v kosterním svalstvu a v játrech

(Villarreal-Molina et al., 2012). Adiponektin souvisí i s imunitním systémem. Na rozdíl od leptinu a resistinu působí prozánětlivě. Snižuje aktivaci a proliferaci T-lymfocytů, působí proti prozánětlivým účinkům TNF- $\alpha$  a naopak zvyšuje expresi protizánětlivých molekul IL-10 a IL-1RA (Guzik et al., 2006).

Adiponektin má i neuroprotektivní funkci. Snížené hladiny adiponektinu v mozku zvyšují riziko mozkových mrtvic (Nishimura et al., 2008). Souvislost mezi adiponektem a AD je nicméně kontroverzní. Některé studie žádné významné rozdíly v hladinách adiponektinu mezi pacienty s AD a kontrolními jedinci nenašly (Dukic et al., 2015), jiné našly významné zvýšení hladin adiponektinu u pacientů s AD (Khemka et al., 2014). Zvýšené hladiny adiponektinu v cerebrospinální tekutině byly zjištěny i u osob s mírnou kognitivní poruchou oproti kontrolním jedincům (Une et al., 2011). Možným vysvětlením pro tyto kontroverzní výsledky může být fakt, že různé studie detekují odlišné formy adiponektinu (celkový adiponektin nebo vysokomolekulární formy adiponektinu), a proto je ve studiích třeba uvádět, o jakou formu adiponektinu se jedná. Výsledky Framinghamské studie ukazují, že zvýšené hladiny adiponektinu souvisejí se zvýšeným rizikem vzniku demence a AD, ale pouze u žen. Po překročení prahových hodnot, kterých lze u žen dosáhnout, se adiponektin stává rizikovým faktorem pro vznik a rozvoj neurodegenerativních onemocnění (van Himbergen et al., 2012).

#### ADIPSIN

Adipsin byl poprvé popsán již v roce 1987 (Cook et al., 1987). O dva roky později byl popsán pod jiným názvem – komplement-faktor D (Rosen et al., 1989). Adipsin je exprimován převážně tukovými buňkami, v menší míře monocytami a makrofágy (White et al., 1992). Adipsin je součástí dráhy adiposin-acylation-stimulating protein, která reguluje syntézu triacylglycerolů (Cianflone et al., 2003). Hladiny adipsinu se přirozeně zvyšují s věkem.

Adipsin je důležitým pojítkem mezi tukovými buňkami, obezitou a funkcí  $\beta$ -buněk pankreatu. Obézní jedinci mají zvýšené hladiny adipsinu oproti štíhlým jedincům (Derosa et al., 2013). Hladiny adipsinu v séru i v cerebrospinální tekutině jsou zvýšené u pacientů s diabetem 1. i 2. typu a u osob s hypertenzí (Schmid et al., 2015). U pacientů s diabetem 2. typu, kteří mají již poškozené  $\beta$ -buňky pankreatu, jsou však hladiny adipsinu v tukové tkáni i v séru naopak nižší než u diabetiků s normální funkcí  $\beta$ -buněk (Lo et al., 2014). Adipsin tedy pravděpodobně pomáhá ke správné sekreci  $\beta$ -buněk pankreatu. Pokud dojde k poškození jater toxickými látkami, adipsin podporuje regeneraci jaterní tkáně (Cresci et al., 2015). Nedostatek adipsinu byl mimo jiné popsán i u lipodystrofií, tzn. u poruchy metabolismu a rozložení tukové tkáně v těle (Sprong et al., 2006).

Koncentrace adipsinu v séru a v cerebrospinální tekutině pozitivně koreluje s parametry zánětu (CRP, imunoglobuliny, laktát apod.). Adipsin prochází přes hematoencefalickou bariéru a jeho zvýšené hladiny v cerebrospinální tekutině mohou poukazovat na patologický stav a přítomnost neurologického onemocnění. Koncentrace adipsinu v cerebrospinální tekutině je významně vyšší i u pacientů s infekčními chorobami (Schmid, et al., 2015), např. u pacientů s opakujícími se meningokokovými infekcemi (Sprong et al., 2006).

Zdá se tedy, že vyšší koncentrace cirkulujícího adipsinu může vypovídat o lokálním a systémovém zánětu (Schmid et al., 2015).

Jak přesně působí v patogenezi AD, není zatím úplně jasné. Současné studie však naznačují, že by adipsin mohl být jedním z potenciálních prediktivních faktorů neurodegenerativního onemocnění, včetně AD.

#### RESISTIN

Resistin je adipokin tvořený 114 aminokyselinami, který byl poprvé identifikován u obézních myši. U myši je hlavním místem produkce resistinu tuková tkáň. U lidí jsou hlavním místem produkce makrofágy. Kromě tukové tkáně byl resistin objeven i v kosterním svalstvu, placentě, pankreatu, žaludku, tenkém střevě, thymu nebo ve štítné žláze (Nohira et al., 2004). Obecně lze říci, že u myši je resistin hormonem tukové tkáně, kdežto u lidí působí spíše jako cytokin, který je produkován buňkami imunitního systému (Haluzik et al., 2010).

Hladiny resistinu jsou zvýšené u obézních jedinců. Resistin je zapojen do proliferace adipocytů a do angiogeneze (Mu et al., 2006). První funkční studie ukázala, že resistin je důležitý spojovací článek mezi obezitou a diabetem 2. typu (Steppan et al., 2001). Hladiny resistinu se zvyšují s přibývajícím věkem, u žen jsou vyšší než u mužů. Naopak u hlodavců jsou vyšší hladiny resistinu u samců než u samic (Yannakoulia et al., 2003). Tento rozdíl ukazuje, že pohlaví může být jedním z faktorů, které ovlivňují expresi resistinu.

Studie na hlodavcích ukázaly, že resistin zvyšuje hladiny glukózy v krvi, koncentraci inzulínu a podporuje inzulínovou rezistenci (Shuldiner et al., 2001). Dále bylo u hlodavců prokázáno, že protilátky proti resistinu snižují hladinu glukózy a zlepšují inzulínovou senzitivitu (Ukkola et al., 2002).

Resistin souvisí se zánětem. Jedinci s klinicky závažným zánětem mají výrazně vyšší koncentrace resistinu oproti zdravým jedincům (Stejskal et al., 2003). Některé zánětlivé markery (např. TNF- $\alpha$ , IL-6) mohou regulovat genovou expresi resistinu a mohou ho dávat do souvislosti se zánětlivými onemocněními, např. s aterosklerózou nebo artritidou. Kromě zánětlivých onemocnění byly nalezeny zvýšené hladiny resistinu i u pacientů se spánkovou apnoe (Pang et al., 2006).

V souvislosti s AD může mít resistin neuroprotektivní efekt. Bylo zjištěno, že resistin může zlepšovat funkčnost mitochondrií (mitochondriální dysfunkce je jedním z příznaků rozvoje AD) a bránit odumírání nervových buněk (Zhu et al., 2006). Snížený mitochondriální membránový potenciál (MMP) je jedním ze základních příčin dysfunkce mitochondrií. Studie Liu et al. ukázala, že u buněk N2a/D9 (N2a neuroblastomová buněčná linie u myši obsahující velké množství neuronů a neurofilament používaná ke studiu neurotoxicity a AD; D9 s mutací v APP a  $\Delta 9$  deletovaným presenilinem-1) je oproti kontrolním N2a/Wt buňkám (Wt s prázdným vektorem) významně snížený MMP, zvýšený oxidační stres, více reaktivních forem kyslíku (ROS) a dusíku (RNS). Oxidační stres má vliv na neurotoxicitu  $\beta$ -amyloidu v mozkové tkáni pacientů s AD. Resistin může působit jako ochrana proti účinkům tohoto amyloidu (Liu et al., 2013). Zvýšené ROS spolu se sníženým energetickým metabolismem jsou jedny z nejlépe zdokumentovaných časných abnormalit u AD (Blass, 2000). Nadprodukce ROS vede k interakci volných

radikálů s membránovými fosfolipidy a ke kolapsu MMP. Následně dochází k translokaci cytochromu C z vnitřní membrány do cytosolu a tím k aktivaci kaspázy-3, která vyvolává apoptózu (Green a Reed, 1998). Všechny tyto děje mohou být částečně redukovány působením resistinu. Protektivní efekt resistinu proti cytotoxicitě u N2a/D9 buněk může mít antioxidantní účinky. Díky zmíněným vlastnostem by resistin mohl být potenciálním faktorem využívaným v léčbě AD.

#### VISFATIN

Visfatin byl jako adipokin popsán v roce 2005 (Fukuhara et al., 2005). Později se ukázalo, že tento protein byl popsán již v roce 1994 jako *pre-B cell colony-enhancing factor* (Samal et al., 1994). Dnes je visfatin znám také pod názvem nikotinamid fosforibosyltransferáza (NAMPT). Původní studie předpokládaly, že jediným místem sekrece visfatinu je viscerální tuková tkáň. Později se ukázalo, že kromě tukové tkáně je visfatin exprimován v mnoha dalších tkáních a orgánech – v mozku, játrech, kostní dřeni a v kosterním svalstvu. Visfatin se může nacházet ve dvou odlišných formách – jako intracelulární forma, která má především funkci enzymu, nebo jako extracelulární forma s funkcí prozánětlivého cytokinu.

Asociace visfatinu s obezitou je kontroverzní. Byly publikovány studie, které u obézních jedinců zjistily jak vyšší hladiny visfatinu v plazmě (Mercader et al., 2008), tak i snížené hladiny (Li et al., 2006). Zvýšené hladiny visfatinu byly zaznamenány u pacientů s metabolickým syndromem a s diabetem 2. typu (Chen et al., 2006). U pacientů s diabetem 2. typu koncentrace visfatinu pozitivně koreluje s vaskulárním poškozením a endoteliální dysfunkcí (Yilmaz, 2008). Ze studií vyplývá (Chan et al., 2007; Shen et al., 2010), že visfatin hraje důležitou roli ve vývoji folikulů, má vliv na ovariální funkci a kvalitu oocytů. Studie Šrámkové et al. zabývající se hladinami visfatinu v průběhu menstruačního cyklu však žádné významné změny nezaznamenala (Šrámková et al., 2015).

Visfatin má schopnost napodobovat funkci inzulínu, tedy schopnost snižovat hladinu glukózy v krvi. Váže se na inzulínový receptor, který následně aktivuje (Fukuhara et al., 2005). Nicméně souvislost mezi visfatinem a inzulínovou senzitivitou měřenou z lačných hodnot inzulínu a glukózy ani euglykemickým hyperinzulinemickým clampem nebyla prokázána (Al-Suhaimi et al., 2013).

Visfatin souvisí i s imunitním systémem, kde působí jako prozánětlivý marker. Hladiny intracelulárního visfatinu jsou zvýšené v přítomnosti zánětlivých molekul (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , Ang II) a extracelulární visfatin může vyvolávat zvýšenou proliferaci a zánět vaskulárních buněk. Visfatin by proto mohl být potenciálně využitý pro farmakoterapii (Romacho et al., 2013).

Hladiny visfatinu se během přirozeného stárnutí zvyšují. Visfatin působí toxicky v mozku kůže, v hippocampu i v dalších částech mozku (Adams, 2008). Visfatin/NAMPT vytváří nikotinamid mononukleotid (NMN) z nikotinamidu (Nam) a ATP. Plazmatický NMN je pomocí CD38, NAD pyrofosfatázy a dalších enzymů přeměněn na nikotinamidadenin dinukleotid (NAD). NAD může být pomocí extracelulárních dehydrogenáz redukován na NADH – na základní substrát NADH oxidázy. Tento enzym se nachází na povrchu

endoteliálních buněk, monocytů, makrofágů, ale i na povrchu leukocytů. NADH oxidáza produkuje volné kyslíkové radikály. Díky tomuto redoxnímu ději mohou abnormálně vysoké hladiny visfatinu vést k poškození hematoencefalické bariéry, k akumulaci  $\beta$ -amyloidu a k následnému poškození mozku (Adams, 2008). Všechny tyto faktory hrají důležitou roli ve vzniku a rozvoji AD.

#### ZÁVĚR

Jak ukazují epidemiologické studie, adipokiny hrají důležitou úlohu v mnoha biologických procesech. Svoji specifickou roli mají v obezitě, lipidovém a glukózovém metabolismu, inzulinové senzitivitě, hypertenzi, imunitní odpovědi i v zánětu. Kromě výše zmíněného jsou adipokiny spojovány i s možným vznikem neurodegenerativních onemocnění včetně Alzheimerovy nemoci. Znalost mechanismu působení adipokinů může přispět ke zlepšení diagnostiky a v některých případech i terapie tohoto onemocnění.

#### LITERATURA

- Adams JD Jr. Alzheimer's Disease, Ceramide, Visfatin and NAD. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 2008;7(6):492–8.
- Al-Suhaimi EA, Shehzad A. Leptin, resistin and visfatin: the missing link between endocrine metabolic and immunity. *European Journal of Medical Research* 2013;18(1):12.
- Barrata M. Leptin – from a signal of adiposity to a hormonal mediator in peripheral tissues. *Med Sci Monit* 2002;8(12):282–292.
- Berg AH, Combs TP, Scherer PE. ACRP30/adiponectin: an adipokine regulating glucose and lipid metabolism. *Trends Endocrinol Metab* 2002;13(2):84–9.
- Blass JP. The mitochondrial spiral. An adequate cause of dementia in the Alzheimer's syndrome. *Ann N Y Acad Sci* 2000;924:170–83.
- Blüher M, Mantzoros ChS. From leptin to other adipokines in health and disease: Facts and expectations at the beginning of the 21st century. *Metabolism* 2015;64(1):131–45.
- Cianflone K, Xia Z, Chen LY. Critical review of acylation-stimulating protein physiology in humans and rodents. *Biochimica et Biophysica Acta* 2003;1609:127–143.
- Cook KS, Min HY, Johnson D, Chaplinsky RJ, Flier JS, Hunt CR, Spiegelman BM. Adipsin: a circulating serine protease homolog secreted by adipose tissue and sciatic nerve. *Science* 1987;237(4813):402–5.
- Cresci GA, Allende D, McMullen MR, Nagy LE. Alternative complement pathway component Factor D contributes to efficient clearance of tissue debris following acute CCl(4)-induced injury. *Molecular Immunology* 2015;64:9–17.
- Česká alzheimerovská společnost [online]. [cit. 22.10.2015]. Dostupné z: [www.alzheimer.cz](http://www.alzheimer.cz)
- Derosa G, Fogari E, D'Angelo A, Bianchi L, Bonaventura A, Romano D, Maffioli P. Adopocytokine levels in obese and non-obese subjects: an observational study. *Inflammation* 2013; 36(4):914–20.
- Dukic L, Simundic AM, Martinic-Popovic I, Kackov S, Diamandis A, Begcevic I, Diamandis EP. The role of human kallikrein 6, clusterin and adiponectin as potential blood biomarkers of dementia. *Clin Biochem* 2015;50009–9120(15)00480-4.

13. European prevention of Alzheimer's dementia consortium [online]. [cit. 3.11.2015]. Dostupné z: <http://www.imi.europa.eu/content/epad>
14. Fantuzzi G, Faggioni R. Leptin in the regulation of immunity, inflammation, and hematopoiesis. *J Leukoc Biol* 2000;68(4):437–46.
15. Farooqi IS, Matarese G, Lord GM, Keogh JM, Lawrence E, Agwu C, Sanna V, Jebb SA, Perna F, Fontana S, Lechler RI, DePaoli AM, O'Rahilly S. Beneficial effects of leptin on obesity, T cell hyporesponsiveness, neuroendocrine/metabolic dysfunction of human congenital leptin deficiency. *J Clin Invest* 2002;110(8):1093–103.
16. Fewlass DC, Noboa K, Pi-Sunyer FX, Johnston JM, Yan SD, Tezapsidis N. Obesity-related leptin regulates Alzheimer's Abeta. *FASEB J* 2004;18(15):1870–8.
17. Fukuhara A, Matsuda M, Nishizawa M, Segawa K, Tanaka M, Kishimoto K, Matsuki Y, Murakami M, Ichisaka T, Murakami H, Watanabe E, Takagi T, Akiyoshi M, Ohtsubo T, Kihara S, Yamashita S, Makishima M, Funahashi T, Yamanaka S, Hiramatsu R, Matsuzawa Y, Shimomura I. Visfatin: a protein secreted by visceral fat that mimics the effects of insulin. *Science* 2005;307(5708):426–30.
18. Greco SJ, Sarkar S, Johnston JM, Zhu X, Su B, Casadesus G, Ashford JW, Smith MA, Tezapsidis N. Leptin reduces Alzheimer's disease-related tau phosphorylation in neuronal cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;376:536–41.
19. Greco SJ, Sarkar S, Johnston JM, Tezapsidis N. Leptin regulates tau phosphorylation and amyloid through AMPK in neuronal cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2009;380(1):98–104.
20. Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science* 1998;281(5381):1309–12.
21. Guzik TJ, Mangalat D, Korb R. Adipocytokines – novel link between inflammation and vascular function? *J Physiol Pharmacol* 2006;57(4):505–28.
22. Haluzik M, Fiedler J, Nedvídková J, Ceska R. Serum leptin concentrations in patients with combined hyperlipidemia: relationship to serum lipids and lipoproteins. *Physiol Res* 1999;48(5):363–8.
23. Haluzik M, Papezová M, Nedvídková J, Kábrt J. Serum leptin levels in patients with anorexia nervosa before and after partial refeeding, relationships to serum lipids and biochemical nutritional parameters. *Physiol Res* 1999;48(3):197–202.
24. Haluzik M, Trachta P, Haluziková D. Hormony tukové tkáně. *Vnitř Lék* 2010;56(10):1028–1034.
25. Harvey J. Leptin: a diverse regulator of neuronal function. *J Neurochem* 2007;100:307–13.
26. Havel PJ. Control of energy homeostasis and insulin action by adipocyte hormones: leptin, acylation stimulating protein, and adiponectin. *Curr Opin Lipidol* 2002;13(1):51–9.
27. Holden KF, Lindquist K, Tylavsky FA, Rosano C, Harris TB, Yaffe K. Serum leptin level and cognition in elderly: findings from the Health ABC Study. *Neurobiol Aging* 2009;30(9):1483–9.
28. Chan TF, Chen YL, Chen HH, Lee CH, Jong SB, Tsai MM. Increased plasma visfatin concentrations in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 2007;88(2):401–5.
29. Chen MP, Chung FM, Chang DM, Tsai JC, Huang HF, Shin SJ, Lee YJ. Elevated plasma level of visfatin/pre-B cell colony-enhancing factor in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91(1):295–9.
30. Khemka VK, Bagchi D, Bandyopadhyay K, Bir A, Chattopadhyay M, Biswas A, Basu D, Chakrabarti S. Altered serum levels of adipokines and insulin in probable Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 2014;41(2):525–33.
31. Li L, Yang G, Li Q, Tang Y, Yang H, Li K. Changes and relations of circulating visfatin, apelin and resistin levels in normal, impaired glucose tolerance, and type 2 diabetic subjects. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2006;114(10):544–8.
32. Liu J, Chi N, Chen H, Zhang J, Bian Y, Cui G, Xiu C. Resistin protection against endogenous Aβ neuronal cytotoxicity from mitochondrial pathway. *Brain Res* 2013;1523:77–84.
33. Lo JC, Ljubicic S, Leibiger B, Kern M, Leibiger IB, Moede T, Kelly ME, Chatterjee Bhowmick D, Murano I, Cohen P, Banks AS, Khandekar MJ, Dietrich A, Flier JS, Cinti S, Blüher M, Danial NN, Berggren PO, Spiegelman BM. Adipsin is an adipokine that improve β cell function in diabetes. *Cell* 2014;158(1):41–53.
34. Meier U, Gressner AM. Endocrine regulation: review of pathobiochemical and clinical chemical aspects of leptin, ghrelin, adiponectin, and resistin. *Clin Chem* 2004;50(9):1511–25.
35. Mercader J, Granados N, Caimari A, Olivek P, Bonet ML, and Palou A. Retinol-binding protein 4 and nicotinamide phosphoribosyltransferase/visfatin in rat obesity models. *Hormone and Metabolism Research* 2008;40(7):467–72.
36. Minokoshi Y, Kim YB, Peroni OD, Fryer LG, Muller C, Carling D, Kahn BB. Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature* 2002;415:339–43.
37. Mu H, Ohashi R, Yan S, Chai H, Yang H, Lin P, Yao Q, Chen C. Adipokine resistin promotes in vitro angiogenesis of human endothelial cells. *Cardiovasc Res* 2006;70(1):146–57.
38. Nishimura M, Izumiya Y, Higuchi A, Shibata R, Qiu J, Kudo C, Shin HK, Moskowitz MA, Ouchi N. Adiponectin prevents cerebral ischemic injury through endothelial nitric oxide synthase dependent mechanisms. *Circulation* 2008;117:216–223.
39. Nohira T, Nagao K, Kameyama K, Nakai H, Fukumine N, Okabe K, Kitano S, Hisatomi H. Identification of an alternative splicing transcript for the resistin gene and distribution of its mRNA in human tissue. *Eur J Endocrinol* 2004;151(1):151–4.
40. Oomura Y, Hori N, Shiraishi T, Fukunaga K, Takeda H, Tsuji M, Matsumiya T, Ishibashi M, Aou S, Li XL, Kohno D, Uramura K, Sougawa H, Yada T, Wayner MJ, Sasaki K. Leptin facilitates learning and memory performance and enhances hippocampal CA1 long-term potentiation and CaMKII phosphorylation in rats. *Peptides* 2006;27(11):2738–49.
41. Pang S and Yingying Le. Role of resistin in inflammation and inflammation-related diseases. *Cellular & Molecular Immunology* 2006;3(1):29–34.
42. Park S, Jang JS, Jun DW, Hong SM. Exercise enhances insulin and leptin signaling in the cerebral cortex and hypothalamus during dexamethasone-induced stress in diabetic rats. *Neuroendocrinology* 2005;82:282–93.
43. Polák J, Klimčáková E, Kováčiková M, Vítková M, Bajzová M, Hejnová J, Štich V. Endokrinní funkce tukové tkáně v etiopatogenezi inzulinové rezistence. *Interní Med* 2006;10:443–446.
44. Romacho T, Villalobos LA, Cercas E, Carraro R, Sánchez-Ferrer CF, Peiró C. Visfatin as a novel mediator released by inflamed human endothelial cells. *PLoS One* 2013;8(10):e78283.
45. Rosen BS, Cook KS, Yaglom J, Groves DL, Volanakis JE, Damm D, White T, Spiegelman BM. Adipsin and complement factor D activity: an immune-related defect in obesity. *Science* 1989;244(4911):1483–7.
46. Ryan AS, Berman DM, Nicklas BJ, Sinha M, Gingerich RL, Meneilly GS, Egan JM, Elahi D. Plasma adiponectin and leptin levels, body composition, and glucose utilization in adult

- women with wide ranges of age and obesity. *Diabetes Care* 2003;26(8):2383–8.
47. Samal B, Sun Y, Stearns G, Xie Ch, Suggs S and McNiece I. Cloning and characterization of the cDNA encoding a novel human pre-B-cell colony-enhancing factor. *Molecular and Cellular Biology* 1994;14(2):1431–1437.
  48. Shen CJ, Tsai EM, Lee JN, Chen YL, Lee CH, Chan TF. The concentrations of visfatin in the follicular fluid of women undergoing controlled ovarian stimulation are correlated to the number of oocytes retrieved. *Fertil Steril* 2010;93(6):1844–50.
  49. Shuldiner AR, Yang R, Gong DW. Resistin, obesity, and insulin resistance – the emerging role of the adipocyte as an endocrine organ. *N Engl J Med* 2001;345:1345–6.
  50. Scherer PE, Williams S, Fogliano M, Baldini G, Lodish HF. A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *J Biol Chem* 1995;270(45):26746–9.
  51. Schmid A, Hochberg A, Berghoff M, Schlegel J, Karrasch T, Kaps M, Schäffler A. Quantification and regulation of adiponectin in human cerebrospinal fluid (CSF). *Clin Endocrinol (Oxf)* 2015;0:1–9.
  52. Skurk T, van Natmelen V, Lee YM, Wirth A, Gauner H. Relationship between IL-6, leptin and adiponectin and variables of fibrinolysis in overweight and obese hypertensive patients. *Horm Metab Res* 2002;34(11-12):659–63.
  53. Spranger J, Kroke A, Möhlig M, Bergmann MM, Ristow M, Boeing H, Pfeiffer AF. Adiponectin and protection against type 2 diabetes mellitus. *Lancet* 2003;361(9353):226–8.
  54. Sprong T, Roos D, Weemaes C, Neeleman C, Geesing CL, Mollnes TE, van Deuren M. Deficient alternative complement pathway activation due to factor D deficiency by 2 novel mutations in the complement factor D gene in a family with meningococcal infections. *Blood* 2006;107:4865–4870.
  55. Staiger H, Tschritter O, Machann J, Thamer C, Fritsche A, Maerker E, Schick F, Häring HU, Stumvoll M. Relationship of serum adiponectin and leptin concentrations with body fat distribution in humans. *Obes Res* 2003;11(3):368–72.
  56. Stárka L. Diabetes mellitus 3. typu?? *DMEV* 2009;12(1):16–18.
  57. Stejskal D, Adamovská S, Bartek J, Juráková R, Prosková J. Resistin-concentrations in persons with type 2 diabetes mellitus and in individuals with acute inflammatory disease. *Biomed Pap Med* 2003;147(1):63–9.
  58. Steppan CM, Bailey ST, Bhat S, Brown EJ, Banerjee RR, Wright CM, Patel HR, Ahima RS, Lazar MA. The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* 2001;409(6818):307–12.
  59. Šrámková M, Dušková M, Vítků J, Včelák J, Matucha P, Bradnová O, de Cordeiro J, Stárka L. Levels of adipokines and some steroids during the menstrual cycle. *Physiol Res* 2015;64(2):147–54.
  60. Tezapsidis N, Johnston JM, Smith MA, Ashford JW, Casadeus G, Robakis NK, Wolozin B, Perry G, Zhu X, Greco SJ, Sarkar S. Leptin: A Novel Therapeutic Strategy for Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis* 2009;16(4):731–40.
  61. Tschritter O, Fritsche A, Thamer C, Haap M, Shirkavand F, Rahe S, Staiger H, Maerker E, Häring H, Stumvoll M. Plasma adiponectin concentrations predict insulin sensitivity of both glucose and lipid metabolism. *Diabetes* 2003;52(2):239–43.
  62. Turer AT, Scherer PE. Adiponectin: mechanistic insights and clinical implications. *Diabetologia* 2012;55(9):2319–26.
  63. Ukkola O. Resistin – a mediator of obesity-associated insulin resistance or an innocent bystander? *Eur J Endocrinol* 2002;147:571–4.
  64. Une K, Takei YA, Tomita N, Asamura T, Ohru T, Furukawa K, Arai H. Adiponectin in plasma and cerebrospinal fluid in MCI and Alzheimer's disease. *Eur J Neurol* 2011;18(7):1006–9.
  65. van Himbergen TM, Beiser AS, Ai M, Seshadri S, Otokozawa S, Au R, Thongtang N, Wolf PA, Schaefer EJ. Biomarkers for insulin resistance and inflammation and the risk for all-cause dementia and Alzheimer disease: results from the Framingham Heart Study. *Arch Neurol* 2012;69(5):594–600.
  66. Villarreal-Molina MT, Antuna-Puente B. Adiponectin: anti-inflammatory and cardioprotective effects. *Biochimie* 2012;94(10):2143–9.
  67. Warren MW, Hynan LS, Weiner MF. Lipids and adipokines as risk factors for Alzheimer's disease. *J Alzheimers D* 2012;29(1):151–7.
  68. White RT, Damm D, Hancock N, Rosen BS, Lowell BB, Usher P, Flier JS, Spiegelman BM. Human adiponectin is identical to complement factor D and is expressed at high levels in adipose tissue. *The Journal of biological chemistry* 1992;267:9210–9213.
  69. Wu ZJ, Cheng YJ, Gu WJ, Aung LH. Adiponectin is associated with increased mortality in patients with already established cardiovascular disease: a systematic review and meta-analysis. *Metabolism* 2014;63(9):1157–66.
  70. Yannakoulia M, Yiannakouris N, Bluher S, Matalas AL, Klimis-Zacas D, Mantzoros CS. Body fat mass and macronutrient intake in relation to circulating soluble leptin receptor, free leptin index, adiponectin, and resistin concentrations in healthy humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:1730–1736.
  71. Yilmaz MI, Saglam M, Carrero JJ, Qureshi AR, Caglar K, Eyileten T, Sonmez A, Cakir E, Yenicesu M, Lindholm B, Stenvinkel P, Axelsson J. Serum visfatin concentration and endothelial dysfunction in chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant* 2008;23(3):959–65.
  72. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 1994;372(6505):425–32.
  73. Zhu X, Perry P, Moreira PI, Aliev G, Cash AD, Hirai K, Smith MA. Mitochondrial abnormalities and oxidative imbalance in Alzheimer disease. *J Alzheimers Dis* 2006;9(2):147–153.

*Mgr. Gabriela Vacinová*  
*Endokrinologický ústav*  
*Oddělení molekulární endokrinologie*  
*Národní 8*  
*116 94 Praha 1*  
*e-mail: gvacinova@endo.cz*



#### 2.4.2. Alzheimerova nemoc a cytokiny

Cytokiny jsou glykoproteiny, které regulují funkce imunitního systému. Jedná se o velkou skupinu mediátorů, do které patří interleukiny (ILs), tzv. colony-stimulating faktory (CSFs), interferony (IFNs), tumor nekrotické faktory (TNFs) a růstové faktory. Cytokiny jsou produkovány imunitními buňkami, tukovou tkání, žírnými buňkami, fibroblasty, buňkami endotelu i keratinocyty (Szalecki et al., 2018).

Cytokiny mohou působit autokrinně, parakrinně i endokrinně. Ovlivňují přežívání, proliferaci, diferenciaci a homeostázu lymfoidních buněk. Jejich hlavní funkcí je iniciace a regulace imunologické odpovědi a zánětu (Pagani et al., 2005). Cytokiny mohou mít prozánětlivé (navozují nebo posilují zánětlivou odpověď) nebo protizánětlivé účinky (tlumí zánětlivou odpověď). Na cílových buňkách působí prostřednictvím specifických membránových receptorů.

Interleukiny jsou cytokiny vylučované leukocyty a makrofágy. Jsou zapojeny do komunikace mezi leukocyty, které regulují velké množství biologických procesů a imunitních odpovědí. Interakce interleukinů a jejich receptorů s endoteliálními buňkami moduluje proces angiogeneze (Ribatti, 2009).

Mezi cytokiny s prozánětlivým účinkem patří interleukin-6 (IL-6). IL-6 je produkován hlavně monocyty a makrofágy, ale může být produkován i T a B lymfocyty, fibroblasty nebo adipocyty. Většina cirkulujícího IL-6 je pak produkována tukovou tkání. IL-6 působí prostřednictvím svého receptoru IL-6R, který má tyrosin-kinázovou aktivitu a je přítomen buď na buněčných membránách, nebo v rozpustné formě. IL-6 se podílí na regulaci imunitní odpovědi, a to jak její iniciací, tak i jejím udržením. Dále řídí navádění a aktivaci leukocytů (Akdis et al., 2011).

U pacientů s AD byly zjištěny vyšší hladiny IL-6 v periférii oproti zdravým kontrolám. IL-6 hraje důležitou roli v zánětlivé kaskádě a může klinicky korelovat se stupněm AD (Swardfager et al., 2010; Leung et al., 2013). Některé studie uvádějí, že AD je primárně imunologicky řízený proces, a že IL-6 je asociován se změnou metabolismu amyloidového prekursorového proteinu (Cojocararu et al., 2011). Vzhledem k tomu, že se zjistilo, že hladiny IL-6 v séru korelují s jeho hladinami v cerebrospinální tekutině (Sun et al., 2003), periferní hladiny IL-6 mohou být využity jako jeden z markerů pro určení progresu AD.

Mezi cytokiny s protizánětlivým účinkem patří interleukin-10 (IL-10). Tento cytokin je důležitým regulátorem několika aspektů imunitní odpovědi. IL-10 je sekretován jako homodimer složený ze dvou podjednotek. Tento cytokin přímo ovlivňuje funkci antigen-prezentujících buněk (Akdis et al., 2009).

IL-10 inhibuje syntézu a uvolňování mnoha prozánětlivých cytokinů (IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 a TNF- $\alpha$ ), chemokinů a jejich receptorů. Zprostředkovává toleranci na alergeny v alergeno-specifické imunoterapii a po expozici vysokých dávek alergenu (Meiler et al., 2008). IL-10 tlumí expresi prozánětlivých cytokinů, která je indukována lipopolysaharidy. Díky inhibici aktivity NADPH oxidázy redukuje neurotoxicitu indukovanou těmito lipopolysacharidy (Qian et al., 2006) a potlačuje apoptózu neuronů zprostředkovanou kaspázou 3 (Lynch et al., 2004).

Studie na hlodavcích ukázala, že myši s deficitem IL-10 mají při periferní lipopolysacharidové infekci výrazně zhoršené kognitivní funkce oproti *wild-type* jedincům (Richwine et al., 2009). To podporuje myšlenku, že IL-10 má terapeutický potenciál pro zlepšování neurozánětu a pro zmírnění kognitivní dysfunkce a neurodegenerace.

Tumor nekrotické faktory tvoří rodinu transmembránových proteinů, která je produkována makrofágy, a to nejčastěji v reakci na přítomnost infekce nebo zánětu. Nejznámější je tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). Jedná se o glykoprotein tvořený 157 aminokyselinami. Tento cytokin je vylučován aktivovanými monocyty a makrofágy, v menší míře pak adipocyty, keratinocyty, fibroblasty, některými lymfocyty atd. Působí prostřednictvím svých receptorů (TNF-R1 a TNF-R2). Je jedním z hlavních cytokinů, které se účastní zánětlivé odpovědi – podílí se na odpovědi při akutní fázi zánětu. TNF- $\alpha$  aktivuje transkripční faktor NF- $\kappa$ B, který iniciuje produkci dalšího pro-zánětlivého cytokinu IL-6 (Shoelson et al., 2007). Svoji úlohu hraje také v inhibici vývoje neoplastických nádorů a inhibici replikace virů. V periférii TNF- $\alpha$  zvyšuje inzulinovou rezistenci (Szalecki et al., 2018).

Studie zjistily, že vysoké koncentrace TNF- $\alpha$  u chronických onemocnění zhoršují růstové procesy (Gaspari et al., 2011). Zdá se, že TNF- $\alpha$  dále snižuje koncentraci IGF-1 a narušuje expresi receptorů pro růstový hormon v játrech. Růstové destičky jsou poté k IGF-1 rezistentní, snižuje se diferenciací chondrocytů a dochází k jejich častější apoptóze

(Choukair et al., 2014). V neposlední řadě TNF- $\alpha$  inhibuje produkci testosteronu v Leydigových buňkách a ovariální steroidogenezi (Wong et al., 2006).

U pacientů s AD byly zjištěny vyšší koncentrace TNF- $\alpha$  v periférii oproti kontrolním jedincům (Swardfager et al., 2010). Ze studií vyplývá, že hladiny tohoto cytokinu se pravděpodobně zvyšují sice mírně, ale nepřetržitě po celou dobu onemocnění (Brosseron et al., 2014).

Mezi cytokiny patří i rozpustný CD40 ligand (sCD40L). Jedná se o transmembránovou molekulu zapojenou do buněčné signalizace vrozené i adaptivní imunity. sCD40L je exprimován mnoha druhy tkání, nejvíce T-lymfocyty a krevními destičkami. Tento rozpustný ligand má cytokinovou aktivitu. Váže se na specifický receptor CD40, který patří do velké rodiny receptorů tumor nekrotických faktorů. Interakce mezi CD40 a sCD40L vyvolává aktivaci, diferenciaci a proliferaci imunitních buněk, stejně tak jako up-regulaci některých cytokinů (Chen et al., 2006a). Dále dochází k produkci vaskulárního endotelového růstového faktoru, který je zapojen do procesu angiogeneze a remodelace cév (Yu et al., 2016).

V souvislosti s AD bylo zjištěno, že interakce sCD40L s CD40 může spouštět produkci  $\beta$ -amyloidních peptidů. Pacienti s AD měli vyšší hladiny tohoto ligandu v periférii oproti zdravým seniorům (Volmar et al., 2009). Díky tomu by sCD40L mohl být jedním z důležitých biomarkerů AD s vysokou specifitou.

Další studie prováděné *post-mortem* uvádějí, že i signalizace receptoru CD40 hraje roli v patogenezi AD. Inhibice CD40L vede ke snížení  $\beta$ -amyloidní produkce a k aktivaci mikroglie u myších modelů AD (Calingasan et al., 2002). Tato aktivace mikroglie indukovaná  $\beta$ -amyloidními peptidy a fosforylace tau proteinu jsou závislé na interakci CD40-CD40L. Bylo zjištěno, že rozpustný CD40 receptor koreluje s APP- $\alpha$  a s APP- $\beta$ , což naznačuje, že signalizace CD40 receptoru je asociována se štěpením APP pomocí  $\alpha$ - a  $\beta$ -sekretáz (Buchhave et al., 2009). Ze studií vyplývá, že vztah mezi hladinami sCD40L a stupněm závažnosti AD, stejně tak jako schopnost sCD40L předpovídat další rozvoj AD, poukazuje na patogenetickou roli tohoto zánětlivého biomarkeru (Desideri et al., 2008). sCD40L může být podle těchto studií přímo zapojen do různých forem patofyziologie AD.

Obecně byly cytokiny zkoumány i z hlediska kontextu s neurozánětem, tedy procesem předcházejícím rozvoji neurodegenerativních onemocnění včetně AD. Jedna

z hlavních funkcí neurozánětu je aktivace mikroglíí, která zahrnuje lokální změny v expresi cytokinů (Rao et al., 2012). Hladiny cytokinů poté mohou stoupat v odpovědi na stárnutí a stres. Chronický zánět a systémová infekce byly prokázány jako jedny z rizikových faktorů pro rozvoj AD ve stáří. Naopak mnohé rizikové faktory pro AD jsou spouštěči systémového zánětu (Perry, 2010).

### **2.4.3. Alzheimerova nemoc a parametry neurodegenerace**

Kromě některých adipokinů a cytokinů se na rozvoji AD podílejí i biomarkery, které přímo souvisejí s degenerací nervových buněk. Mezi vyšetření neurodegenerativních parametrů, která souvisejí s AD, patří nejčastěji stanovení množství tau proteinu a  $\beta$ -amyloidního peptidu v cerebrospinální tekutině. Odběr cerebrospinální tekutiny je však invazivní vyšetření. Oproti tomu odběr periferní krve je vyšetření snadno proveditelné. Díky částečné propustnosti hematoencefalické bariéry mohou některé látky související s neurodegenerací přecházet do periferie, kde by mohly vypovídat o změnách souvisejících s přítomností AD.

Mezi parametry souvisejícími s neurodegenerací patří cystatin C. Cystatin C je endogenní inhibitor cysteinových proteináz, složený ze 120 aminokyselin. Reguluje intra- a extracelulární aktivitu lysosomálních katepsinů. Jeho sekrece probíhá ve všech tělesných tkáních a je dostupný ve všech tělesných tekutinách. Cystatin C moduluje různé fyziologické procesy. Bylo prokázáno, že hraje klíčovou roli v ochraně před poraněním tkání, které je způsobeno uvolňováním cysteinových peptidáz během procesu poškození. Celkově lze tedy říci, že cystatin C přímo inhibuje endo- a exogenní cysteinové peptidázy, účastní se modulace imunitního systému, má antibakteriální a antivirální aktivitu a přispívá k odpovědi na poškození mozkové tkáně (Mussap and Plebani, 2004).

Studie *in vitro* i *in vivo* ukazují neuroprotektivní roli cystatinu C v patogenezi AD. Cystatin C váže  $\beta$ -amyloidní peptid a inhibuje shlukování a ukládání jeho vláken v závislosti na koncentraci, čímž chrání mozkovou tkáň proti toxickým účinkům  $\beta$ -amyloidů (Sastre et al., 2004). Studie prováděné na myších modelech ukázaly, že nadměrná exprese cystatinu C redukuje hromadění  $\beta$ -amyloidů přímou interferencí mezi monomerním cystatinem C a monomerním  $\beta$ -amyloidem (Mi et al., 2007).

V souvislosti s tau proteinem byla naopak nalezena pozitivní korelace – zvýšené hladiny tau proteinu byly asociovány se zvýšenými hladinami cystatinu C v cerebrospinální

tekutině (CSF). Tato pozitivní korelace je pravděpodobně způsobena tím, že exprese a sekrece cystatinu C stoupá v reakci na progresi neurodegenerace. Tato studie však nenašla rozdíly v hladinách cystatinu C mezi pacienty s AD a zdravými kontrolami v cerebrospinální tekutině (Sundelöf et al., 2010). To nemusí nutně znamenat, že cystatin C se neúčastní patogeneze AD, ale otázkou zůstává, zda může být použit jako biomarker pro AD.

Mezi další látky, které souvisejí s neurodegenerací, patří neurotrofní faktory. Tyto proteiny hrají klíčovou úlohu v přežívání nervových buněk. V případě poškození nervových buněk se účastní jejich regenerace. Jedním z těchto faktorů je *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF). BDNF je hojně přítomen v CNS (hlavně v oblasti hippocampu, mozkové kůry a v amygdale) a je dostupný pro některé neurony periferního nervového systému, které vychytávají neurotrophin produkovaný tkáněmi periferie. BDNF podporuje přežívání a diferenciaci některých nervových buněk během jejich vývoje. V dospělosti je důležitý pro synaptickou plasticitu. Je zapojen do mechanismů hippocampu pro učení a utváření paměti a do spinálních mechanismů souvisejících s bolestí (Pezet and Malcangio, 2004).

U AD byla zaznamenána snížená mRNA exprese BDNF v hippocampu a parietální mozkové kůře (Garzon et al., 2002). Genetické studie ukázaly, že polymorfismus v genu, který kóduje BDNF, koreluje s pozdní formou AD, a že zvyšuje riziko vzniku této formy AD (Kunugi et al., 2001). Lokální podání exogenního BDNF může mít pozitivní účinek na ochranu před AD, a to hlavně v raných stádiích. Podáním BDNF může dojít k zastavení progresu, k menší ztrátě neuronů a ke zlepšení následného kognitivního poklesu. Studie ukázaly, že BDNF má prospěšný efekt na učení a paměť u zvířecích modelů (Ando et al., 2002).

BDNF prochází přes hematoencefalickou bariéru (Pan et al., 1998), jeho hladiny v séru jsou však v souvislosti s AD kontroverzní. Některé studie zjistily snížené hladiny v séru u pacientů s AD oproti zdravým kontrolám (Laske et al., 2007), jiné zjistily významně zvýšené serologické koncentrace BDNF u AD pacientů (Angelucci et al., 2010). Studie Pláteníka et al. zjistila snížené hladiny BDNF v plazmě bohaté na krevní destičky. Autoři této studie se domnívají, že snížené hladiny BDNF v plazmě odrážejí snížené hladiny BDNF v mozkové tkáni, a proto je tento faktor důležitým ukazatelem v patofyziologii AD (Pláteník et al., 2014).

Mezi další parametry souvisejícími s neurodegenerací patří růstové faktory. Tyto látky jsou nejčastěji bílkovinné povahy a indukují buněčnou proliferaci. Do této skupiny patří *platelet-derived growth factor* (PDGF). PDGF tvoří skupinu růstových faktorů, která je mimo jiné syntetizována buňkami mozkové tkáně, a to konkrétně neuronálními progenitory, neurony, astrocyty a oligodendrocyty. PDGF působí autokrinně i parakrinně a svoji úlohu hraje během celého vývoje jedince (Sil et al., 2018). PDGF se dělí do pěti funkčních podskupin. Každá skupina je tvořena polypeptidovými řetězci A-, B-, C- nebo D-, které tvoří homo- nebo heterodimery spojené disulfidickou vazbou (Kazlauskas, 2017). Tyto podjednotky působí prostřednictvím svých receptorů (PDGFR) přes receptorovou tyrosinkinázovou aktivitu.

Signalizace zprostředkovaná PDGF reguluje děje v centrální nervové soustavě, jako jsou neurogeneze, synaptogeneze, buněčné přežívání nebo vývoj specifických typů neuronů. Společné působení PDGF a PDGFR může vyvolat odlišné až paradoxní situace v centrální nervové soustavě v závislosti na buněčném typu a na aktivačních podnětech. Např. v případě endoteliálních buněk indukce PDGF může vést k porušení hematoencefalické bariéry a následnému neurozánětu. Na druhou stranu PDGF může neuronům poskytovat trofickou podporu proti celé řadě neurotoxických agens, a to jak buněčného, tak i virového původu (Sil et al., 2018).

Mezi neurodegenerativní parametry mohou patřit i chemokiny. Chemokiny jsou podskupinou cytokinů, které mají chemotaktický účinek. Jedním z těchto chemokinů je *regulated upon activation normal T cell expressed and secreted* (RANTES). RANTES známý také jako CCL5 (*C-C chemokine ligand 5*) je protein složený z 68 AA. Patří do rodiny chemokinů, která reguluje pohyb buněk. Zprostředkovává pohyb a navigaci T-lymfocytů, monocytů, basofilních a eozinofilních buněk, *natural killer* buněk, dendritických a žírných buněk (Appay and Rowland-Jones, 2001). Vyvolává migraci mononukleárních fagocytujících buněk přes hematoencefalickou bariéru do oblastí zánětu (Ubogu et al., 2006a). RANTES působí prostřednictvím svých specifických receptorů CCR5, CCR3 a CCR1.

V CNS je RANTES exprimován mikrogliovými buňkami a astrocyty v závislosti na přítomnosti zánětu (Stuart and Baune, 2014). Má potenciální roli v myelinizaci, protože je schopný prostřednictvím receptoru CCR1 indukovat proliferaci oligodendrocytů, které jsou důležité pro přesné shlukování myelinu v CNS (Kadi et al., 2006).

RANTES společně s receptorem CCR5 jsou zapojeny do signalizace metabolické regulace, glukózové intolerance a inzulínové resistance v hypotalamu. (Chou et al., 2016). Změny v hladinách RANTES jsou dávány do souvislosti s poraněním mozku (Lumpkins et al., 2008), posttraumatickým stresem (Oglodek et al., 2015) a neurodegenerativními onemocněními včetně AD (Marksteiner et al., 2011; Liu et al., 2014; Azizi et al., 2014).

#### **2.4.4. Alzheimerova nemoc a steroidní hormony**

Steroidní hormony jsou efektivní regulátory mnoha fyziologických procesů včetně těch, které probíhají v mozkové tkáni. Steroidy hrají svoji roli v protektivních a reparativních procesech, apoptóze, podporují neurogenezi a myelinizaci a přispívají k redukci neurozánětu (Hampl and Bičíková, 2010). Mohou se vyskytovat v konjugované (ve vazbě se sulfátem nebo kys. glukuronovu) nebo nekonjugované formě, jako volné nebo navázané na transportní bílkoviny (albumin, SHBG). Podle počtu atomu uhlíků je můžeme rozdělit do tří následujících skupin – C21, C19 a C18. C21 steroidy mají dvouuhlíkový postranní řetězec na pozici C17 a methylové skupiny na pozicích C10 a C13; C19 steroidy mají keto- nebo hydroxyskupinu na pozici C17 a methylové skupiny na pozicích C10 a C13; C18 steroidy mají hydroxyskupinu na pozici C3 a aromatizovaný první kruh, keto- nebo hydroxyskupinu na pozici C17 a methylovou skupinu na pozici C13.

V CNS jsou steroidní hormony a jejich metabolity obvykle definovány jako neuroaktivní steroidy (působí v CNS, ale vznikají mimo její oblast) nebo neurosteroidy (vznikají i působí v CNS). Jejich syntéza může probíhat buď *de novo* z cholesterolu gliovými buňkami a neurony, nebo mohou být syntetizovány v periférii gonádami (u žen pouze v reprodukčním období) a nadledvinami (hlavní zdroj u žen po menopauze) (Mellon and Griffin, 2002). Do CNS jsou pak transportovány přes hematoencefalickou bariéru. Transport může probíhat buď přímo, nebo ve formě prekurzorů. Mezi hlavní neuroaktivní steroidy patří pregnenolon, dehydroepiandrosteron (DHEA), progesteron, 5 $\alpha$ -dihydroprogesteron, allopregnanolon, deoxykortikosteron, tetrahydrodeoxykortikosteron a estradiol. Neuroaktivní steroidy hrají důležitou roli jako rychlé endogenní modulátory dráždivosti nervových buněk (Carta et al., 2012).

Koncentrace steroidů v mozkové tkáni je díky lipofilní povaze těchto hormonů obvykle několikrát vyšší než jejich koncentrace v periférii nebo CSF. Nicméně steroidy mohou prostupovat přes hematoencefalickou membránu a ve většině případů jejich hladiny v periférii korelují s hladinami v CSF. Díky tomuto pasivnímu transportu pomocí

transmembránové difuze dochází k rovnováze mezi periferií a CSF (Kancheva et al., 2011). Bylo zjištěno, že periferní aplikace estradiolu a progesteronu ukazuje srovnatelné koncentrace v plazmě a CSF s maximem 15 minut po aplikaci (van den Berg et al., 2004). Z toho vyplývá, že přesun steroidů z periferie do oblastí CNS je důležitý, a že změny v periferní steroidogenezi mohou ovlivňovat neuronální aktivitu v mozkové tkáni.

Ztráta steroidních hormonů v průběhu stárnutí je dávana do souvislosti s různými změnami a onemocněními, jako jsou tkáňová atrofie, zhoršený stav kostí, akumulace tuku, diabetes 2. typu, ale také s kognitivními problémy, ztrátou paměti a pravděpodobně i s AD. Studie ukázaly, že změny v biosyntéze steroidních hormonů mohou přispívat k patologii AD (Liu et al., 2013; Winkler and Fox, 2013).

Steroidní hormony přímo ovlivňují formování  $\beta$ -amyloidního peptidu a fosforylaci tau proteinu. (Hampl and Bičíková, 2010). Produkce  $\beta$ -amyloidních peptidů vyžaduje dvě následná štěpení APP indukovaná pomocí enzymů  $\beta$ - a  $\gamma$ -sekretázy. Alternativní štěpení je způsobené  $\alpha$ -sekretázou – tzv. non-amyloidogenní hypotéza (viz kapitola 2.2.). Bylo prokázáno, že cholesterol (prekurzor steroidních hormonů) zůstává v mozkové tkáni pacientů s AD. V případě poškození jeho metabolismu dochází ke změně aktivit  $\beta$ - a  $\gamma$ -sekretáz (Xiong et al., 2008). Kromě toho steroidy ovlivňují imunitní systém a zdá se, že by mohly mít potenciální využití v léčbě AD (Alvarez-de-la-Rosa et al., 2005; Cherrier, 2009; Hampl and Bičíková, 2010).

Mezi rizikové faktory AD patří narušení fungování osy hypotalamus-hypofýza-nadledviny. Např. zvýšené hladiny kortizolu mohou zvyšovat riziko vzniku AD. Kortizol patří mezi glukokortikoidy a je produkován kůrou nadledvin. Studie *in vitro* i *in vivo* prováděné na zvířatech ukázaly, že podávání glukokortikoidů při stresových podmínkách zvyšuje tvorbu  $\beta$ -amyloidu tím, že dojde ke zvýšení hladin APP a BACE1 (*beta-site APP cleaving enzyme 1*), který vyvolává formování  $\beta$ -amyloidů. To naznačuje, že zvýšené hladiny glukokortikoidů u pacientů s AD nejsou pouze důsledkem tohoto onemocnění, ale že spíše hrají důležitou roli ve vývoji a progresi tohoto onemocnění (Green et al., 2006).

DHEA je steroidní hormon, který je schopný tlumit expresi a aktivitu enzymu BACE1, a tím bránit štěpení APP  $\beta$ -sekretázou – tedy štěpení APP na delší nerozpustné fragmenty (Tamagno et al., 2003). Studie ukázaly, že DHEA, který může být v mozkové tkáni lokálně transformován na estrogény (DHEA je prekurzorem androgenů a estrogenů),



zlepšuje paměť a procesy spojené s učením (Vallee et al., 2001). Díky imunoprotektivním vlastnostem a příznivému vlivu na apoptotickou kaskádu, patří DHEA mezi perspektivní složky využitelné při léčbě AD.

Obecně lze říci, že terapeutický potenciál steroidních hormonů spočívá v příznivém ovlivnění enzymů účastnících se buněčného cyklu nebo jednotlivých kroků tohoto procesu. V souvislosti s patologickými účinky tau proteinu bylo prokázáno, že estradiol působí proti hyperfosforylaci tau proteinu (Alvarez-de-la-Rosa et al., 2005). Estradiol dále snižuje aktivitu protein kinázy A, která je zapojena do patologie tohoto proteinu (Liu et al., 2008). Na druhou stranu nepříznivé efekty na enzymy, které jsou zodpovědné za hyperfosforylaci tau proteinu, bývají způsobeny glukokortikoidy. Lze tedy říci, že glukokortikoidy umocňují hromadění tau proteinu (Green et al., 2006).

Role steroidních hormonů v patogenezi a léčbě AD je dáována i do souvislosti s jejich vlivem na přežívání neuronů, respektive na jejich apoptózu. Steroidy, a to především glukokortikoidy, DHEA a jejich metabolity a prekurzory, jsou zapojeny do různých signalizačních drah souvisejících s přežíváním a apoptózou. Dlouhodobé působení glukokortikoidů spojené s nadměrnou aktivitou osy hypotalamus-hypofýza-nadledviny vede ke zhoršení kognitivních funkcí (Herman and Seroogy, 2006). Studie na krysích modelech ukázaly, že glukokortikoidy mohou předcházet, ale zároveň také urychlovat neurodegeneraci v hippocampu. Tento rozdílný efekt je vysvětlován adaptivními mechanismy zapojenými do signalizačních drah (Charalampopoulos et al., 2006). DHEA a jeho aktivní metabolity ve většině případů fungují v mozkové tkáni jako činitelé zabraňující apoptóze. V některých případech může DHEA naopak podporovat apoptózu nervových buněk (Lin et al., 2004).

### 3. Hypotézy a cíle práce

#### 3.1. Genetická část

Hlavním společným patogenetickým faktorem mezi pacienty s AD a pacienty s *diabetem mellitem 2. typu* (DM2) je inzulínová rezistence (Han and Li, 2010), která je klíčovým faktorem pro vznik DM2 a je jedním z rizikových faktorů, které ovlivňují zhoršení kognitivních funkcí. Inzulínová rezistence je porucha v účinku inzulínu a je definována jako stav, při kterém normální hladiny inzulínu v plazmě vyvolávají nižší odpověď organismu, tj. dochází k nedostatečnému poklesu hladiny glukózy v krvi. Při inzulínové rezistenci je proto pro zajištění správné biologické odpovědi organismu nutná vyšší hladina inzulínu. Tato kompenzace však po určité době může vést k vyčerpání pankreatu a hladina glukózy v krvi se začne zvyšovat. V organismu dochází k relativnímu nedostatku inzulínu a vzniká DM2.

Inzulínová rezistence se netýká pouze periferních tkání. Přítomnost inzulínu a inzulínových receptorů je dnes prokázána i v řadě oblastí centrální nervové soustavy. Inzulín prochází přes hematoencefalickou bariéru a je vychytáván pomocí specifických receptorů, jejichž koncentrace s věkem klesá. Na rozdíl od periferních tkání si inzulín v centrální nervové soustavě zachoval funkci růstového faktoru a má vliv na synaptogenezi a růst nervových buněk. Přítomnost inzulínu v mozkové tkáni brání nasedání oligomerů na povrch neuronů, které způsobují jejich apoptózu. V případě inzulínové rezistence mozkové tkáně může docházet ke zhoršení kognitivního chování. Tato rezistence může vést k inhibici degradace  $\beta$ -amyloidního peptidu nebo ke zvýšení fosforylace tau proteinu (Li et al., 2010b). Otázkou zůstává, zda periferní inzulínová rezistence a rezistence v mozkové tkáni spolu souvisí nebo zda se jedná o dva nezávislé procesy. Pacienti s diabetem mají 1,5-4x vyšší riziko vzniku AD i vaskulární demence (Takeda et al., 2010), která se často vyskytuje společně s AD, ale může být přítomná i samostatně.

Vzhledem k prokázané souvislosti diabetu s poruchami kognitivních funkcí, které jsou často patrné i u mladších diabetiků, je asociaci AD s DM2 věnována značná pozornost. Pravděpodobný společný patogenetický faktor – inzulínová rezistence, je klíčový jak pro vznik DM2, tak je i rizikem pro zhoršení kognitivních funkcí u AD. Otázkou je, zda geny kandidátní pro vznik a rozvoj AD mohou souviset s inzulínovou rezistencí obecně a zda zjištění frekvencí vybraných rizikových polymorfismů kandidátních genů pro AD

v české populaci s různým stupněm glukózové tolerance prokáže významný vliv ve vztahu genotyp – fenotyp.

Tato práce se proto zaměřila na vybrané polymorfismy kandidátních genů pro AD *BINI*, *CLU*, *CRI* a *PICALM* u pacientů s DM2, pacientek s gestačním diabetem (GDM) v anamnéze a u osob s porušenou glukózovou tolerancí (PGT). Dále se zaměřila na hledání nových variant ve vybraných exonech těchto genů a ve všech exonech genu *APOE*.

Cíle genetické části práce jsou následující:

- 1) Detekovat jednotlivé varianty ve vybraných polymorfismech kandidátních genů pro AD (rs744373 v genu *BINI*, rs11136000 v genu *CLU*, rs381361 v genu *CRI*, rs3851179 v genu *PICALM*) u pacientů s DM2, GDM, osob s PGT a u kontrolních jedinců a zjistit, zda tyto varianty souvisí s poruchami glukózového metabolismu.
- 2) Pomocí masivně paralelního sekvenování najít nové varianty ve vybraných exonech kandidátních genů *APOE*, *BINI*, *CLU*, *CRI* u pacientů s AD a kontrolních seniorů a najít případnou souvislost těchto variant s AD.

### 3.2. Biochemická část

I když je známá již řada patobiochemických a neurochemických změn, které vedou k morfologickým alteracím charakteristickým pro AD, mechanismy, které jsou jejich příčinou, zatím zcela objasněny nebyly. Z biochemického hlediska je typickým rysem AD celková porucha oxidativního metabolismu v mozkové tkáni, což vede k nedostatečnému přívodu energie a k postupné neurodegeneraci. K dalším charakteristickým změnám pro AD patří poruchy imunitního systému nebo dysregulace metabolismu steroidních hormonů, které zasahují do mnoha signálních cest. Zajímavě se jeví i propojení AD a DM2 založené na metabolických poruchách tukové tkáně, která je zdrojem celé řady látek klíčových pro obě onemocnění. Mezi látky, které tuková tkáň produkuje, patří adipokiny a některé cytokiny.

Cíle biochemické části práce jsou následující:

- 3) Zjistit hladiny vybraných adipokinů a inkretinů (GIP, GLP-1, leptin, resistin, visfatin, adiposin a adiponektin), cytokinů (IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22, IL-23, IL-25, IL-31, IL-33, IFN- $\gamma$ , sCD40L a TNF- $\alpha$ ) a parametrů spojených s neurodegenerací (BDNF, MPO, NCAM, PDGF-AA, PDGF-AB/BB,

RANTES, sICAM-1 a sVCAM-1, cystatin C, enolasa-2) u pacientů s AD a kontrolních seniorů a najít jejich případnou souvislost s AD.

- 4) Zjistit hladiny rozšířeného spektra cirkulujících steroidních hormonů a aktivitu enzymů steroidogeneze predikovanou na základě poměrů produktů k prekurzorům (tj. konjugovaných/nekonjugovaných steroidů) u pacientů s AD a porovnat výsledky se skupinou kontrolních seniorů.

#### 4. Soubory a metodika

Sběr biologického materiálu probíhal kontinuálně již od roku 1999 v Endokrinologickém ústavu v Praze. V rámci různých studií byli vyšetřováni pacienti s diabetem 2. typu (DM2), pacientky s gestačním diabetem (GDM) v anamnéze, jedinci s porušenou glukózovou tolerancí (PGT) a zdravé kontroly bez zatížení některé z výše uvedených poruch glukózové tolerance.

Mezi lety 2012–2015 byli ve spolupráci s Thomayerovou nemocnicí v Praze vyšetřováni pacienti s AD. Kritéria pro přijetí pacientů do studie byla následující: mírná nebo středně pokročilá fáze onemocnění (schopnost pochopit podmínky účasti ve studii a podepsat informovaný souhlas), věk nad 65 let. Pacienti s AD byli diagnostikováni na základě mezinárodních kritérií NINCDS-ADRA (National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke and the Alzheimer's Disease and Related Disorders Association). U pacientů byla provedena neuropsychologická vyšetření, magnetická rezonance hlavy a vyšetření cerebrospinální tekutiny. Neuropsychologická vyšetření zahrnovala následující tři testy: RBANS (Repeatable Battery for the Assessment of Neuropsychological Status), MoCA (Montreal Cognitive Assessment) a GDS (Global Deterioration Scale). Dále bylo provedeno antropometrické měření, kdy byly pacientům změřeny následující parametry: tělesná výška, váha, obvody pasu, břicha, boků a paže. Z naměřených hodnot byl vypočítán BAI index a hodnota BMI (Tab. 2). Vyšetření kontrolních seniorů probíhala ve stejném období v Endokrinologickém ústavu v Praze. Kritéria pro přijetí do studie byla následující: negativní neuropsychologická vyšetření, negativní nález na MRI, souhlas se studií potvrzený podpisem informovaného souhlasu, věk nad 60 let. Kontrolní senioři absolvovali stejný protokol vyšetření jako pacienti s AD kromě odběru cerebrospinální tekutiny. Kromě vlastního vyšetření dále vyplňovali dotazníky zaměřené na osobní i rodinnou anamnézu metabolických a neurodegenerativních onemocnění.

Tab 2. Výsledky antropometrických měření u pacientů s AD a kontrolních seniorů uvedených pomocí indexů BMI a BAI a pomocí WHR

	AD muži (n=39)			ADK muži (n=23)			p hodnota
	medián	95% LCL	95% UCL	medián	95% LCL	95% UCL	
BMI [kg/m <sup>2</sup> ]	26,3	24,2	27,4	26,3	25	29,6	0.3
BAI [%]	26,3	24,4	26,8	32,1	20	33,9	0,99
WHR [cm]	0,91	0,88	0,93	0,95	0,9	0,97	0.05
	ženy (n=46)			ženy (n=53)			
	medián	95% LCL	95% UCL	medián	95% LCL	95% UCL	
BMI [kg/m <sup>2</sup> ]	25,5	23	27,7	26,2	24,4	27,4	0.38
BAI [%]	32,7	28,9	34,4	32,1	30	33,9	0.77
WHR [cm]	0,82	0,79	0,85	0,82	0,79	0,84	0.98

Statistický program NCSS 2004; p, hladina významnosti; Kruskal-Wallis One-Way ANOVA test; AD, pacienti s AD; ADK, kontrolní seniori; BMI, body mass index; BAI - body adiposity index; WHR, waist to hips ratio; LCL, lower control limit; UCL, upper control limit

Tab. 3 shrnuje léčbu u souboru pacientů s AD. Tab. 4 shrnuje léčbu metabolických a hormonálních onemocnění u souboru pacientů s AD a u kontrolního souboru (ADK). U prováděných biochemických analýz jsme brali v úvahu možný vliv léčby a jednotlivých farmak na výsledné hodnoty sledovaných parametrů.

Všichni jedinci uvedení v této práci byli podrobně seznámeni s průběhem studie. Podepsáním informovaného souhlasu schváleného Etickou komisí Endokrinologického ústavu v Praze souhlasili se zařazením do studie.

Tab. 3 Léčba pacientů s AD

<b>léčba</b>	
<b>antidepressiva – selektivní inhibitory zpětného vychytávání serotoninu</b> cipralex, citalex, lenuxin, seropram, zoloft, miraklide, sertralin, asentra, citalopram	25,8 %
<b>antidepressiva – jiná antidepressiva</b> argofan, coaxil, efectin, mirtazapin, tritico, mirzaten, olwexya	8,2 %
<b>antipsychotika (neuroleptika) – benzamidy</b> dogmatil, tiapridal	3,1 %
<b>antipsychotika (neuroleptika) – deriváty butyrofenonu</b> buronil, haloperidol	2,1 %
<b>antipsychotika (neuroleptika) – jiná antipsychotika</b> rispen	4,1 %
<b>antipsychotika (neuroleptika) – benzodiazepinové deriváty</b> grandaxin	1 %
<b>antiparkinsonika – dopa a její deriváty</b> isicom, nacom, nakom mite	8,2 %
<b>psychostimulancia – anticholinesterázy</b> alzil, aricept, exelon, yasnal	53,6 %
<b>psychostimulancia – jiná psychostimulancia a nootropika</b> pirabene, geratam piracetam	4,1 %
<b>psychostimulancia – ostatní léčiva proti demenci</b> ebixa antagonist N-methyl-D-aspartátových receptorů (NMDA) - memantin	17,5 %

Tab. 4 Léčba metabolických a hormonálních onemocnění u pacientů s AD a kontrolních seniorů

<b>léčba</b>	<b>AD (n=97)</b>	<b>ADK (n=65)</b>
<b>hypolipidemika – inhibitory HMG CoA reductázy</b> atoris, atorvastatin, apo-simva, lescol, simgal, simvacard, coralip, sortis, tulip, torvacard, rosucard, gensil, zocor	21,6 %	15,4 %
<b>hypolipidemika – fibráty</b> lipanthyl, lipirex, suprelip	1 %	3,1 %
<b>hypotenziva – ACE inhibitory</b> amprilan, accupro, gleperil, gopten, perinalon, piramil, prenessa, prestarium, ramil, inhibace, tritace, dapril, enap, accuzide, quinapril, prestance, tarka, tonarssa	29,9 %	10,8 %
<b>hypotenziva – beta-blokátory selektivní</b> acecor, emzok, betaloc, betaxa, egilok, lokren, sectral, apo-acebutol	21,6 %	4,6 %
<b>hypotenziva – ostatní</b> cynt, rilmenidin, tenaxum, lorista, lozap, kylotan, twynstra, telmisartan, Blessin plus H, micardis, unipres, lusopress, cardura, kamiren	20,6 %	15,4 %
<b>vazodilatancia (všechna)</b> betahistin, cinarizin, apo-amlo, agen, zorem, orcal neo, enelbin, cavinton, pentomer retard, sorbimon, mono mack depot, sermion	21,6 %	12,3 %
<b>anxiolytika – benzodiazepinové deriváty</b> lexaurin, neurol, oxazepam	3,1 %	0 %
<b>hypnotika, sedativa – léčiva podobná bezodiazepinům</b> hypnogen, zolpidem	1 %	1,5 %
<b>antidiabetika (všechna)</b> glimepirid, diaprel, oltar, glyclada, glucobene, glucophage, siofor, eucreas	10,3 %	0 %
<b>antidiabetika – inzuliny a analogy dlouze působící</b> levemir	1 %	0 %
<b>hormony – glukokortikoidy</b> prednison	1 %	0 %
<b>hormony – hormony štítné žlázy</b> euthyrox, letrox, thyreotom	6,2 %	6,2 %

AD, pacienti s AD; ADK, kontrolní seniři



#### 4.1. Genetická část

Genetická část předkládané práce obsahuje vyšetření 2345 jedinců. Tento početný soubor zahrnuje skupinu pacientů s AD (97) a k nim věkem odpovídající skupinu kontrolních seniorů (76), pacientky s GDM v anamnéze (550), pacienty s DM2 (392), jedince s PGT (117) a odpovídající zdravé kontroly k jednotlivým skupinám bez poruchy glukózového metabolismu (1113).

U všech jedinců byla provedena izolace DNA z plné krve. Pro izolaci na přístroji QuickGene 610L (FujiFilm Life Science, Japonsko) byl použit QuickGene DNA whole blood kit L (KURABO Industries, Japonsko). Po změření koncentrace a čistoty byla získaná DNA naředěna na pracovní koncentraci 10 ng/μl a uchovávána při -20°C.

U 2172 jedinců (pacientky s GDM, pacienti s DM2, jedinci s PGT a odpovídající zdravé kontroly) byly zjišťovány frekvence jednotlivých variant ve vybraných polymorfismech kandidátních genů pro AD. Konkrétně byly vyšetřovány tyto polymorfismy – rs744373 v genu *BINI*, rs11136000 v genu *CLU*, rs3818361 v genu *CRI* a rs3851179 v genu *PICALM*.

Vyšetření byla provedena metodou Real-Time PCR na přístroji LightCycler 480 (Roche, Mannheim, Německo). Pro genotypizaci jednotlivých polymorfismů byly použity komerčně navržené specifické sondy (TaqMan SNP Genotyping Assays, Applied Biosystems).

U pacientů s AD a skupiny kontrolních seniorů byla v rámci diplomové práce, na které tato studie navazuje (Vacínová, 2014) provedena analýza lokusu ve 4. exonu genu *APOE* na zjištění přítomnosti/nepřítomnosti rizikové alely ε4. Toto vyšetření bylo provedeno nejprve pomocí klasické PCR, kdy za pomoci specifických primerů byla namnožena konkrétní oblast genu. Dále byla použita metoda restrikční analýzy (RFLP) za použití restrikční endonukleázy Hha I (Thermo Scientific).

Pro amplifikaci *APOE* lokusu byly použity následující primery:

FWD: GCACGGCTGTCCAAGGAGCTGCAGGC

REV: GGCGCTCGCGGATGGCGCTGAG

Dále byla u pacientů s AD a skupiny kontrolních seniorů provedena analýza vybraných exonů (určeny na základě odborné literatury – Bettens et al., 2012; Harold et al.,

2009; Hu et al., 2011; Kamboh et al., 2012; Ma et al., 2014) kandidátních genů pro AD – 1., 2., 3. a 4. exon genu *APOE*, 6. exon genu *BINI*, 5., 6., 7. a 8. exon genu *CLU*, 38. a 39. exon genu *CRI*. Vybrané oblasti jednotlivých genů byly nejprve namnoženy metodou PCR a poté analyzovány za pomoci masivně paralelního sekvenování na přístroji MiSeq (Illumina, Kalifornie, USA). Pro sekvenování byla použita platforma Nextera XT. Pro vyhodnocení byl použit program Integrative Genomics Viewer (IGV). Použité primery pro amplifikaci vybraných exonů shrnuje Tab. 5.

Tab. 5 Seznam primerů použitých pro amplifikaci vybraných exonů kandidátních genů pro AD

Gen	Exon	Primery	
<i>APOE</i>	1	FWD: AACAGCCCACCTCGTGACTG REV: CTAGCTACCGTGTCGCTGCC	
	2	FWD: CTGAGATGGAACCGGCGGTG REV: GGAGGTTGAGGTGAGGATGAGAG	
	3	FWD: GATTAACCGACTCCCCCCTCA REV: AATTCCAGAGAGCTAAAGCCAGGA	
	4	a	FWD: CTCTTGGGTCTCTCTGGCTCAT REV: CTGCCCATCTCCTCCATCCG
		b	FWD: ATGCCGATGACCTGCAGAAG REV: TAAACTAGGGTCCACCCAGGAG
		c	FWD: CCTGGACGAGGTGAAGGAGCA REV: AAGGGCAGAGAGAAAGATACACACA
	<i>BINI</i>	6	FWD: CAGGAGGAAGCCTCCACCCTC REV: GTTGGTGGCTGTGGAGATGAGAAG
	<i>CLU</i>	5	FWD: AGCTTCACCCCTTCTCACCTC REV: TGACTGTTACAGCCATGGGCAG
		Intron 5	FWD: CCAGCCATGCAGAGATGGACTC REV: CCATGTTCCAGCCCTTCCTTG
6		FWD: ATCTCTAACGACATCTCACCGA REV: TCAGTCGAGTCCATCTCTGCAT	
7		FWD: AATGCTCAGTCAAAGCACACATG REV: CAGTTTGTGGCCCTTCCTTAG	
8		FWD: GGGCTGCAGCTCATCTTGGG REV: GGGTCAGCTCTCTAGGTTTCCTTGG	
<i>CRI</i>	38, 39	FWD: AGCCCTCTGGTAAGCATAAGATAT REV: CCCCTGATCTCAAGAGAGTGATTC	

## 4.2. Biochemická část

Biochemická část předkládané práce obsahuje vyšetření 163 jedinců. Soubor zahrnuje 87 pacientů s AD a 76 zdravých kontrolních seniorů. Vyšetření byla provedena z periferní krve a následně získané plazmy nebo séra. Plazma i sérum byly uchovávány při  $-80^{\circ}\text{C}$  až do jednotlivých analýz. Do dílčích studií byli zařazeni pouze jedinci splňující stanovená kritéria pro danou analýzu.

U pacientů s AD a kontrolních jedinců byla provedena analýza parametrů spojených s neurodegenerací v rámci multiplexové ELISA metody na přístroji BioPlex 200 (Bio-Rad, Kalifornie, USA). Tato metoda funguje na principu navázání protilátek na různě barevné polystyrenové kuličky s magnetickým jádrem, kdy každý odstín odpovídá jednomu analytu. V rámci této analýzy byly vyšetřovány následující parametry: BDNF, MPO, NCAM, PDGF-AA, PDGF-AB/BB, RANTES, sICAM-1 a sVCAM-1 (HNDG3MAG-36K Human Neurodegenerative Disease Magnetic Bead Panel 3, Millipore). Dále byla provedena analýza parametrů enolasa-2 (Human Enolase 2/Neuron-specific Enolase Quantikine ELISA Kit, R&D Systems) a cystatin C (Human Cystatin C Quantikine ELISA Kit, R&D Systems).

Za použití stejné metody byla provedena analýza vybraných adipokinů a inkretinů v rámci multiplexového panelu obsahujícím následující parametry: C-peptid, ghrelin, GIP, GLP-1, glukagon, inzulin, leptin, PAI-1, resistin a visfatin (Bio-Plex Pro Human Diabetes 10-Plex Assay, Bio-Rad). Vyšetření bylo doplněno o další dva adipokiny – adiposin a adiponektin (Bio-Plex Pro Human Diabetes Adipsin and Adiponectin Assays, Bio-Rad), které byly díky nutnosti odlišného ředění analyzovány zvlášť.

Na přístroji Bio-Plex byla dále provedena analýza vybraných cytokinů multiplexovým panelem obsahujícím následující parametry: IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22, IL-23, IL-25, IL-31, IL-33, IFN- $\gamma$ , sCD40L a TNF- $\alpha$  (Bio-Plex Pro Human Th17 Cytokine Assays, Bio-Rad). U všech vyšetření prováděných na přístroji Bio-Plex byla jako vstupní materiál použita krevní plazma.

U vybraných pacientů s AD a kontrolních seniorů byla provedena analýza steroidních hormonů. Celkem bylo stanoveno 44 steroidů a jejich polárních konjugátů (Tab. 6). Vyšetření bylo provedeno pomocí metody plynové chromatografie s hmotnostním spektrometrem (GC-MS) na přístroji GCMS-QP2010 Plus (Schimadzu, Kyoto, Japonsko).

Tab. 6 Steroidy a jejich polární konjugáty stanovené metodou GC-MS

<b>Steroid [nmo/l]</b>
Pregnenolon / pregnenolon sulfát
16 $\alpha$ -Hydroxypregnenolon
20 $\alpha$ -Dihydropregnenolon / 20 $\alpha$ -dihydropregnenolon sulfát
Progesteron
16 $\alpha$ -Hydroxyprogesteron
20 $\alpha$ -Dihydroprogesteron
Allopregnanolon / allopregnanolon sulfát
Isopregnanolon / isopregnanolon sulfát
Pregnanolon / konjugovaný pregnanolon
Konjugovaný 5 $\alpha$ -pregnan-3 $\beta$ ,20 $\alpha$ -diol
Konjugovaný 5 $\beta$ -pregnan-3 $\alpha$ ,20 $\alpha$ -diol
Dehydroepiandrosteron (DHEA) / DHEA sulfát (DHEAS)
7 $\alpha$ -Hydroxy-DHEA
7 $\beta$ -hydroxy-DHEA
16 $\alpha$ -Hydroxy-DHEA / 16 $\alpha$ -hydroxy-DHEAS
Androstenediol / androstenediol sulfát
5-Androsten-3 $\beta$ ,7 $\alpha$ ,17 $\beta$ -triol
5-Androsten-3 $\beta$ ,7 $\beta$ ,17 $\beta$ -triol
Androstenedion
Testosteron
5 $\alpha$ -Dihydrotestosteron
Androsteron / androsteron sulfát
Epiandrosteron / epiandrosteron sulfát
Etiocholanolon / konjugovaný etiocholanolon
Epietiocholanolon / konjugovaný epietiocholanolon
5 $\alpha$ -Androstan-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol / konjugovaný 5 $\alpha$ -androstan-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol
5 $\alpha$ -Androstan-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol / konjugovaný 5 $\alpha$ -androstan-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol
Konjugovaný 5 $\beta$ -androstan-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol
Estron
Estradiol

### 4.3. Statistické analýzy

Statistické analýzy byly provedeny a hodnoceny v programech NCSS 2004 a 2007 (Kaysville, Utah, USA), Statgraphics Centurion verze XV (Herndon, Virginia, USA) a SIMCA-P verze 12.0 (Umea, Švédsko) a v případě potřeby konzultovány se statistikem Endokrinologického ústavu v Praze.

K vyhodnocení frekvenčního zastoupení jednotlivých alel u stanovovaných polymorfismů byly sestrojeny frekvenční tabulky testované v první fázi Fisherovým exaktním testem nebo chí kvadrát testem. Zároveň byla ověřena Hardy-Weinbergova rovnováha.

Metrická data byla nejprve podrobena exploratorní a konfirmatorní analýze a v případě vážných odchylek od distribuční symetrie a v případě nekonstantního rozptylu byla data transformována do Gaussovského rozdělení. Ve studii byly použity metody, jako jsou lineární modely včetně vícefaktorové ANOVA/ANCOVA, vícenásobná regrese (v případě vícerozměrné regrese byly využity metody ortogonálních projekcí do latentní struktury OPLS) atd., které umožňují adjustaci biochemických parametrů na věk, BMI, pohlaví apod., čímž jsme zároveň vyšetřovali závislost sledovaných proměnných na těchto parametrech. V případě neúspěchu transformací byly použity robustní alternativy parametrických testů. Konkrétní statistické analýzy jsou popsány v jednotlivých publikacích (viz Příloha 1-3).

## 5. Výsledky a diskuze

### 5.1. Detekce variant ve vybraných polymorfismech kandidátních genů pro AD u pacientů s DM2, GDM a u osob s PGT

#### 5.1.1. Výsledky

U 2172 jedinců (pacientky s GDM a k nim odpovídající kontroly, pacienti s DM2 a k nim odpovídající kontroly, jedinci s porušenou glukózovou tolerancí) byly stanoveny genotypické a alelické frekvence vybraných polymorfismů: rs744373 v genu *BINI*, rs11136000 v genu *CLU*, rs3818361 v genu *CRI* a rs3851179 v genu *PICALM*. Výsledky analýzy a zastoupení jednotlivých genotypů shrnuje Tab. 7 (viz Příloha) a Obr. 5-8 (viz Příloha).

U genetických variant rs744373 v genu *BINI*, rs11136000 v genu *CLU* a rs3818361 v genu *CRI* nebyla nalezena žádná významná asociace s GDM, DM2 nebo PGT. Varianta rs3851179 v genu *PICALM* byla asociována se zvýšeným rizikem GDM. Frekvence alely C (pravděpodobná asociace s rizikem rozvojem AD) byla významně vyšší u skupiny pacientek s GDM ve srovnání s kontrolní skupinou: OR 1.21; 95% CI (1.03-1.44). Tento trend jsme nepozorovali u pacientů s DM2 ani PGT, naopak alela C v polymorfismu rs3851179 v genu *PICALM* se u skupiny s PGT vyskytovala s nižší frekvencí oproti kontrolnímu souboru: OR 0.67; 95% CI (0.51-0.89).

#### 5.1.2. Diskuze

Tato práce zaměřila na některé kandidátní geny, které vzešly z celogenomových asociačních studií (Harold et al., 2009; Hu et al., 2011; Kamboh et al., 2012). Kromě genu *APOE*, který je prokazatelně spjat s AD, jsme si vybrali geny *BINI*, *CLU*, *CRI* a *PICALM*. Vzhledem k možné souvislosti AD s periferní inzulinovou rezistencí, a tedy i s poruchami glukózového metabolismu, jsme se zaměřili na pacienty s DM2, pacientky s GDM a osoby s PGT. U vybraných polymorfismů rs744373(*BINI*), rs11136000(*CLU*), rs3818361(*CRI*) a rs3851179(*PICALM*) jsme pomocí RealTime PCR detekovali jednotlivé varianty a hledali jsme souvislost těchto variant s výše uvedenými poruchami glukózového metabolismu.

U vybraných polymorfismů rs744373(*BINI*), rs11136000(*CLU*) a rs3818361(*CRI*) tato práce nenašla žádnou souvislost s DM2, GDM nebo PGT. Ve studiích bylo prokázáno, že minoritní alela G polymorfismu rs744373 (*BINI*) koreluje s mírou progresu AD (Tan et al., 2013). Souvislost tohoto polymorfismu s poruchami metabolismu nebo

s přítomností DM2 se v dostupné literatuře neuvádí. Ani naše studie žádnou asociaci mezi rs744373(*BINI*) a jedinci s poruchou glukózového metabolismu nenalezla. Produkt genu *CLU* se podílí na transportu cholesterolu, váže velké množství ligandů včetně lipidů, komplementárních faktorů a  $\beta$ -amyloidních peptidů (Ferrari et al., 2012). Asociace polymorfismu rs11136000 (*CLU*) s AD byla nalezena pomocí GWAS, souvislost tohoto polymorfismu s metabolickými poruchami však dostupné studie neuvádí. V našich sledovaných souborech nebyla nalezena žádná souvislost mezi jedinci s poruchou glukózového metabolismu a tímto polymorfismem. Z GWAS vzešel i další gen *CRI*, který je klíčovým iniciátorem zánětu a může mít souvislost s rizikem vzniku AD (Song et al., 2000). Polymorfismus rs3818361 (*CRI*) má podle studií silnou asociaci s AD. Jeho vztah k metabolickým poruchám a k DM2 není zatím objasněn. V této studii jsme souvislost mezi tímto polymorfismem a jedinci s poruchou glukózového metabolismu nenalezli.

U polymorfismu rs3851179 (*PICALM*) byla nalezena asociace s GDM a PGT. Podle studií je u pacientů s AD zastoupení jednotlivých genotypů CC 45 %, CT 41 % a TT 14 %, alelická frekvence je C 66 %, T 34 % (Harold et al., 2009). Frekvence jednotlivých genotypů u našeho souboru pacientek s GDM je CC 49 %, CT 42 %, TT 9 %, alelická frekvence je C 70 %, T 30 % (Tab. 7, viz Příloha). Zastoupení jednotlivých genotypů mezi pacienty s AD a ženami s GDM ukazuje podobný trend. Frekvence alely C, která je asociována s vyšším rizikem rozvoje AD, je u pacientek s GDM významně vyšší oproti kontrolnímu souboru. U jedinců s PGT je oproti kontrolním jedincům alela C naopak zastoupena s významně nižší frekvencí. Mezi pacienty s DM2 a kontrolními jedinci nebyly ve frekvenci alely C nalezeny žádné významné rozdíly. „Protektivní“ alela T byla u pacientek s GDM zastoupena s významně nižší frekvencí než u kontrolního souboru, a dokonce i s nižší frekvencí než u souboru pacientů s AD. Pacienti s DM2 i jedinci s PGT měli vyšší frekvenci alely T oproti kontrolním souborům. Tyto výsledky naznačují, že patogeneze GDM je odlišná od DM2 i od PGT, a že polymorfismus rs3851179 v genu *PICALM* může mít svou roli.

Asociace genu *PICALM* s vyšším rizikem rozvoje AD byla v některých studiích prokázána (Harald et al., 2009; Carrasquillo et al., 2010; Kamboh et al., 2010), některé jiné studie (Li et al., 2008; Jun et al., 2010) žádnou významnou asociaci nenalezly. O roli proteinu *PICALM* v DM2 v současné době nejsou žádné údaje. V souvislosti s možnou úlohou v patofyziologii GDM je tomu podobně.

Studie ukazují, že PICALM může hrát důležitou úlohu v rovnováze železa. Přenos železa do buněk je závislý na endocytóze zprostředkované clathrinem, které se PICALM účastní. Jedná se o vezikulární transport, který usnadňuje průchod a recyklaci receptorů, které se účastní celé řady procesů včetně vylučování živin (Takei and Haucke, 2001). V případě nadprodukce proteinu PICALM dochází k narušení mechanismu tohoto druhu endocytózy a dojde k narušení schopnosti buněk importovat železo (Scotland et al., 2012).

Rovnováha železa je v případě AD narušena. Koncentrace železa v séru, stejně tak jako koncentrace transferinu (transportní bílkovina pro železo) a feritinu (zásobní bílkovina obsahující železo), jsou u pacientů s AD nižší než u kontrolních jedinců (Crespo et al., 2014). V některých oblastech mozkové tkáně, konkrétně v bazálních gangliích, je u pacientů s AD naopak zvýšená koncentrace železa oproti zdravým jedincům (Bartzokis et al., 2000). V případě GDM je rovnováha železa také narušena. Na rozdíl od AD mají pacientky s GDM vyšší koncentrace železa i feritinu v séru ve srovnání s kontrolním souborem žen. Transport železa u nich probíhá aktivněji oproti ženám bez GDM (Amiri et al., 2013).

Kromě rovnováhy železa, hraje PICALM svoji roli i v lipidové rovnováze a v metabolismu cholesterolu, který je v případě přítomnosti AD nebo DM2 narušen. V případě poruchy proteinu PICALM dojde k odlišné expresi genů zapojených do biosyntézy cholesterolu a jeho ztráta může přispívat k narůstající expresi LDL receptorů na povrchu buněk a ke zvýšení celkového množství cholesterolu. PICALM může být jedním z nezbytných faktorů, který se podílí na správném navádění cholesterolu uvnitř buněk (Mercer et al., 2015).

### **5.1.3. Shrnutí**

Z výsledků naší studie vyplývá, že polymorfismus rs3851179 v genu *PICALM* má souvislost nejen s AD, ale i se specifickou formou poruchy glukózového metabolismu – s GDM. V naší studii frekvence tohoto polymorfismu u žen s GDM odpovídají spíše frekvencím u pacientů s AD než u pacientů s DM2. Tato podobnost sice nevysvětluje přímé spojení obou těchto onemocnění, nicméně by stálo za úvahu prověřit tuto skutečnost v nezávislé studii.

Výsledky byly publikovány v zahraničním impaktovaném časopise (Příloha 1).



## 5.2. Detekce nových variant ve vybraných exonech kandidátních genů *APOE*, *BINI*, *CLU*, *CR1* u pacientů s AD

Masivně paralelní sekvenování (dříve označováno jako sekvenování nové generace) je stále častěji využívaná metoda umožňující sekvenovat tisíce až miliony sekvencí během jedné analýzy. Touto metodou je možné sekvenovat celý genom nebo jen vybrané oblasti zájmu. Jednotlivé vzorky je nutné správně označit pomocí unikátních sekvencí, aby byly při následném vyhodnocování rozlišitelné. Tato metoda je vhodná nejen pro detekci známých a popsáných variant, ale i pro hledání nových variant, které by mohly souviset s AD.

### 5.2.1. Výsledky

U 97 pacientů s AD a 76 kontrolních seniorů bylo provedeno vyšetření vybraných exonů kandidátních genů pro AD. Přítomnost rizikové alely  $\epsilon 4$  ve 4. exonu genu *APOE* byla vyšetřena pomocí restriční analýzy v rámci předchozí studie. V rámci této práce byl vyšetřen celý gen *APOE* za pomoci masivně paralelního sekvenování. Frekvenci jednotlivých alel v genu *APOE* u pacientů s AD a kontrolních seniorů shrnuje Tab. 8.

Tab. 8 Frekvence alel  $\epsilon$  v genu *APOE* u pacientů s AD a kontrolních seniorů

Soubor	AD n=97	ADK n=76	P hodnota
Alela	Frekvence (%)		
$\epsilon 2$	2,1	7,9	0.02
$\epsilon 3$	76,6	79,7	0.53
$\epsilon 4$	21,3	12,4	0.03

Statistický program NCSS 2004; AD, pacienti s AD; ADK, kontrolní seniori; P, hladina významnosti chí-kvadrát test

Z výsledků je patrné, že u pacientů s AD se alela  $\epsilon 4$  vyskytuje s vyšší frekvencí ve srovnání s kontrolním souborem. Naopak alela  $\epsilon 2$  se u pacientů s AD ve srovnání s kontrolními jedinci vyskytuje s nižší frekvencí.

Tato práce se zaměřila na hledání nových variant ve vybraných exonech genu *APOE*, *BINI*, *CLU* a *CR1* pomocí masivně paralelního sekvenování. Vyhodnocovací program IGV (Integrative Genomics Viewer) nám zobrazí referenční sekvenci daného genu a kolikrát byl náš úsek přečten. Odlišnost našeho vzorku od referenční sekvence je pak znázorněna barevně, je zobrazena pozice a pokud je znám tak i rs kód jednotlivé difference. Program

vyhodnotí, k jaké záměně nukleotidu došlo a zda se jedná o homo- nebo heterozygota. Výstup z analýzy popisuje Obr. 9.



Obr. 9 Výstup z analýzy masivně paralelního sekvenování v programu IGV (Integrative Genomics Viewer). Obr. zobrazuje dvě záměny ve 4. exonu genu *APOE* – rs429358 (odpovídá alele  $\epsilon_4$ ) a rs7412 (odpovídá alele  $\epsilon_2$ ). V obou případech se jedná o heterozygota – výsledek tedy odpovídá genotypu  $\epsilon_2/\epsilon_4$ .

Výsledky nalezených genotypů u vybraných exonů kandidátních genů pro AD shrnuje Tab. 9 (viz Příloha). Z výsledků je patrné, že jsme nenašli žádnou novou variantu, která by dosud nebyla popsána (všechny varianty měly již přidělený rs kód). V genu *APOE* byla kromě variant odpovídajících jednotlivým alelám  $\epsilon_2$  (rs7412) a  $\epsilon_4$  (rs429358) nalezena jedna substituční varianta rs769452 ve 3. exonu, a to pouze u tří jedinců. U varianty rs7412, která odpovídá alele  $\epsilon_2$ , byla zaznamenána vyšší frekvence u kontrolních seniorů. Varianta rs429358, která odpovídá alele  $\epsilon_4$ , byla v homozygotním stavu nalezena pouze u pacientů s AD, v heterozygotním stavu byla u pacientů s AD nalezena s vyšší frekvencí ve srovnání s kontrolními jedinci. V genu *BINI* byla nalezena jedna substituce (rs1060743) v 6. exonu. V genu *CLU* byla nalezena jedna substituce (rs7982) v 5. exonu, dvě substituce (rs9331916, rs28541694) v 5. intronu a jedna delece (rs3216167) v 6. intronu. Analýza 38. a 39. exonu v genu *CRI* nenašla žádnou variantu odlišnou od referenční sekvenční.

Z výsledků dále vyplývá, že u nalezených variant (kromě variant ve 4. exonu genu *APOE*) není rozdíl ve frekvenci jednotlivých genotypů mezi pacienty s AD a kontrolními seniory a je tedy pravděpodobné, že tyto varianty nemají souvislost s přítomností AD.

### 5.2.2. Diskuze

Dalším cílem genetické části disertační práce bylo hledání nových variant ve vybraných exonech kandidátních genů (*APOE* – 1., 2., 3. a 4. exon; *BINI* – 6. exon; *CLU* – 5., 6., 7. a 8. exon; *CRI* – 38. a 39. exon) pro AD za pomoci masivně paralelního sekvenování.

Masivně paralelní sekvenování je metoda, která umožňuje rychle a relativně levně sekvenovat kompletní lidský genom. V případě této analýzy je nutné nejprve vytvořit tzv. ampliconovou knihovnu, poté vzorky sekvenovat a na závěr data vyhodnotit a správně interpretovat (Koubková et al., 2014). V případě pozitivního záchytu mutace je potřeba nález ověřit z nezávislého vzorku jinou metodou – nejčastěji pomocí Sangerova sekvenování. Tato technologie je vhodná jak pro cílené sekvenování, tak pro hledání nových mutací a polymorfismů, a tím může pomoci charakterizovat molekulární podstatu jednotlivých onemocnění včetně AD.

V genu *APOE* byly nalezeny varianty, které se nacházejí ve 4. exonu a odpovídají jednotlivým alelám  $\epsilon 2$  (Arg176Cys) a  $\epsilon 4$  (Cys130Arg). Souvislost alely  $\epsilon 4$  s AD byla již několikrát popsána a mechanismus jejího účinku je stále předmětem současných studií (Corder et al., 1993; Bussy et al., 2018). V naší studii je frekvence alely  $\epsilon 4$  vyšší u pacientů s AD ve srovnání s kontrolním souborem, což potvrzuje její asociaci s tímto onemocněním. Dále byla v genu *APOE* ve 3. exonu nalezena jedna substituční varianta rs769452 (Leu46Pro). Tato varianta byla nalezena pouze u tří jedinců. Podle databází a dostupné literatury je tato varianta nejasného významu (Masoodi et al., 2012) a pravděpodobně nemá na vznik a rozvoj AD vliv.

Sekvence 6. exonu v genu *BINI* našla pouze jednu variantu rs1060743 (Thr162=). Jedná se o synonymní variantu, u které nedochází ke změně přítomné aminokyseliny. Podle dostupné literatury, však může tato varianta zvyšovat riziko vzniku pozdní formy AD (Tan et al., 2014). V naší studii se frekvence této varianty mezi pacienty s AD a kontrolními seniory významně nelišila.

V genu *CLU* jsme v naší studii našli 4 varianty. Varianta rs7982 (p.His263=), která se nachází v 5. exonu, má podle studií významnou asociaci s ukládáním  $\beta$ -amyloidních peptidů v mozkové tkáni (Tan et al., 2016). Frekvence této varianty se mezi našimi sledovanými soubory nijak významně nelišila. Dále jsme našli varianty rs9331916 a rs28541694, které se nacházejí v oblasti 5. intronu. V dostupných databázích a odborné literatuře nebyl zatím klinický význam těchto variant popsán. Frekvence obou těchto variant se v naší studii mezi sledovanými soubory významně nelišila. Kromě substitučních variant jsme v genu *CLU* našli i jednu jednonukleotidovou delecí rs3216167 (6316delT). Tato varianta se nachází v oblasti 6. intronu. Varianta byla již v literatuře popsána (Bettens et al., 2012), její asociace s AD však není v současné době známa. V naší studii nebyly nalezeny rozdíly ve frekvenci této delecce mezi sledovanými soubory.

Analýza 38. a 39. exonu genu *CRI* nenašla žádnou variantu, která by se lišila od referenční sekvence.

### 5.2.3. Shrnutí

Z výše uvedeného vyplývá, že tato část disertační práce našla pomocí masivně paralelního sekvenování varianty ve vybraných úsecích kandidátních genů pro AD, všechny nalezené varianty však již byly v databázích nebo v odborné literatuře popsány. Žádná z těchto variant, kromě varianty odpovídající alele  $\epsilon 4$  v genu *APOE*, není popsána jako patogenní. Některé varianty však mají podle dostupné literatury asociaci s AD. V rámci naší studie se nepodařilo najít žádnou novou variantu, která by mohla souviset s AD.

Výsledky této části studie byly prezentovány na domácí konferenci (Příloha 11).

## 5.3. Stanovení vybraných adipokinů, inkretinů, cytokinů a parametrů spojených s neurodegenerací u pacientů s AD a kontrolních seniorů

Tato část práce se zaměřila na studium vybraných adipokinů, inkretinů, cytokinů a parametrů spojených s neurodegenerací. Všechny vybrané analyty byly stanoveny pomocí komerčně navržených multiplexových kitů na přístroji Bio-Plex.

### 5.3.1. Výsledky

V rámci analýzy vybraných adipokinů a inkretinů byly stanoveny následující parametry: leptin, resistin, visfatin, adiposin, adiponektin, GIP, GLP-1. Výsledky naměřených hodnot shrnuje Tab. 10 (viz Příloha). U parametrů leptin, adiposin, adiponektin a GIP jsme v periferní cirkulaci nenašli žádné významné rozdíly mezi pacienty s AD a souborem

kontrolních seniorů. Muži s AD měli vyšší hladiny resistinu ve srovnání s kontrolními seniory. Ženy s AD měly také vyšší hladiny resistinu oproti ženám v kontrolním souboru, rozdíly v naměřených hladinách však byly na hranici statistické významnosti. Pacienti s AD měli dále vyšší hladiny visfatinu oproti kontrolním seniorům. Tento rozdíl byl více patrný u žen s AD, které měly hladiny 2x vyšší ve srovnání se ženami v kontrolním souboru. Pacienti s AD měli vyšší hladiny GLP-1 oproti kontrolnímu souboru.

V rámci analýzy vybraných cytokinů byly stanoveny následující parametry: IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22, IL-23, IL-25, IL-31, IL-33, IFN- $\gamma$ , sCD40L a TNF- $\alpha$ . Pouze tři parametry (sCD40L, TNF- $\alpha$  a IL-6) byly v plazmě pacientů s AD a kontrolních seniorů měřitelné. Zbylé parametry byly pod mezí detekce a nemohly být pro další zpracování dále využity. Výsledky měřitelných parametrů shrnuje Tab. 11 (viz Příloha).

Z výsledků je patrné, že v hladinách IL-6 nejsou významné rozdíly mezi pacienty s AD a kontrolními seniory. Muži s AD mají nižší hladiny TNF- $\alpha$  ve srovnání s kontrolní skupinou, u žen nebyl významný rozdíl pozorován. Hladiny sCD40L byly významně vyšší u pacientů s AD oproti kontrolním seniorům. Tento rozdíl byl výraznější u žen.

V rámci analýzy markerů spojených s neurodegenerací byly stanoveny následující parametry: BDNF, MPO, NCAM, PDGF-AA, PDGF-AB/BB, RANTES, sICAM-1 a sVCAM-1, enolasa-2 a cystatin C. Naměřené hodnoty jednotlivých parametrů spojených s neurodegenerací shrnuje Tab. 12 (viz Příloha).

Analyty BDNF, PDGF-AA a PDGF-AB/BB byly u velké části jedinců v kontrolním souboru pod hladinou detekce. Ve statistických analýzách jsme se zaměřili na parametry detekovatelné u obou souborů. Hladiny parametrů NCAM, sICAM-1, sVCAM-1 a cystatin C se mezi pacienty s AD a kontrolními seniory významně nelišily. Hladiny analytu MPO se mezi muži s AD a muži v kontrolní skupině významně nelišily, ženy s AD měly oproti ženám v kontrolní skupině vyšší hladiny MPO. Hladiny chemokinů RANTES byly mnohonásobně vyšší u pacientů s AD oproti kontrolním seniorům. Hladiny enolasy 2 byly také vyšší u pacientů s AD ve srovnání s kontrolní skupinou, ale rozdíly nebyly tak markantní, jako v případě RANTES.

### 5.3.2. Diskuze

Adipokiny jsou látky produkované tukovou tkání, které se aktivně účastní metabolických procesů v organismu. Svoji úlohu hrají i v zánětlivých procesech, inzulínové senzitivitě nebo imunitní odpovědi (Kiliaan et al., 2014). Mezi adipokiny patří leptin, který má mimo jiné vliv na učení, paměť a synaptickou plasticitu hippocampu (Oomura et al., 2006). Studie ukázaly, že hladiny cirkulujícího leptinu souvisejí s přítomností AD. Bylo zjištěno, že pacienti s AD mají snížené hladiny tohoto adipokinu ve srovnání s kontrolními jedinci, a že leptin redukuje produkci  $\beta$ -amyloidů (Fewlass et al., 2004) i nadměrnou fosforylaci tau proteinu (Greco et al., 2008). Naše studie však rozdíly v hladinách leptinu mezi pacienty s AD a kontrolními seniory nenalezla.

Další adipokin resistin může mít v souvislosti s AD neuroprotektivní efekt. Resistin pomáhá zlepšovat funkčnost mitochondrií a bránit odumírání nervových buněk (Zhu et al., 2006). V séru byly u pacientů s AD naměřeny vyšší hladiny resistinu oproti zdravým jedincům (Demirci et al., 2017). Tato studie našla korelaci resistinu se zánětlivými markery přítomnými u AD, a proto se autoři domnívají, že resistin může hrát úlohu v zánětlivém procesu charakteristickém pro AD. V naší studii jsme našli zvýšené plazmatické hladiny resistinu u pacientů s AD, ale pouze u mužů. U žen nebyly v naměřených hladinách nalezeny žádné rozdíly.

Pacienti s AD měli v naší studii vyšší hladiny visfatinu ve srovnání s kontrolním souborem. Tento rozdíl byl markantněji pozorovatelný u žen, kde byl rozdíl mezi naměřenými hladinami dvojnásobný. Visfatin má schopnost napodobovat funkci inzulínu (Fukuhara et al., 2005), v souvislosti s imunitním systémem působí jako prozánětlivý marker (Romacho et al., 2013). Jeho hladiny se zvyšují během přirozeného stárnutí a v případě abnormálního zvýšení může dojít k poškození hematoencefalické bariéry, k akumulaci  $\beta$ -amyloidů a k následnému poškození mozkové tkáně (Adams, 2008). Studie našly zvýšené hladiny visfatinu u pacientů s metabolickým syndromem a s DM2 (Chen et al., 2006b).

Adiponektin je další ze skupiny adipokinů, který má mimo jiné neuroprotektivní funkci. Jeho souvislost s AD je kontroverzní. Některé studie žádné rozdíly mezi pacienty s AD a kontrolními jedinci nenašly (Dukic et al., 2015), jiné našly zvýšené hladiny u pacientů s AD (Khemka et al., 2014). Naše studie žádné významné rozdíly mezi pacienty a kontrolami nenalezla. Koncentrace dalšího adipokinu adiposinu v séru i v cerebrospinální tekutině pozitivně koreluje s parametry zánětu. Díky průchodnosti přes hematoencefalickou

bariéru se zdá, že by jeho vyšší koncentrace v periférii mohly vypovídat o lokálním a systémovém zánětu (Schmid et al., 2016). V naší studii nebyly nalezeny žádné rozdíly v naměřených hladinách adiposinu mezi sledovanými soubory.

Některé výsledky naší studie týkající se adipokinů se shodují s výsledky studií jiných autorů, některé výsledky jsou kontroverzní. Z toho lze usuzovat, že vyšetření samotných adipokinů pro diagnostiku AD není vhodné, ale v kombinaci s dalšími vyšetřeními, jsou některé adipokiny potenciálně vhodné pro doplnění celkového obrazu stavu pacienta.

Jak ukázaly studie na zvířecích modelech, inkretiny GIP a GLP-1 mohou hrát neuroprotektivní roli v mozkové tkáni (Li et al., 2010b; McClean et al., 2011). Studie uvádí, že GLP-1 dokáže redukovat aktivaci mikroglie a chránit neurony proti oxidativnímu stresu (Bae and Song, 2017). V naší studii měli pacienti s AD vyšší hladiny GLP-1 ve srovnání s kontrolním souborem. Hladiny GIP se mezi sledovanými soubory nijak významně nelišily.

Cytokiny jsou glykoproteiny, které iniciují a regulují imunologickou odpověď a zánět (Pagani et al., 2005). Mohou mít prozánětlivé i protizánětlivé účinky, na cílových buňkách působí prostřednictvím specifických membránových receptorů. Hladiny cytokinů se mění v závislosti na přítomnosti zánětu. V souvislosti s AD bylo zjištěno, že některé cytokiny mohou stimulovat sekreci dalších proteinů, které se nacházejí v senilních placích (Rubio-Perez and Morillas-Ruiz, 2012). Naše studie se zaměřila na prozánětlivé i protizánětlivé cytokiny a jejich plazmatické hladiny. Ze všech cytokinů, které byly v naší studii hodnoceny, byly pouze tři parametry v plazmě měřitelné. Hladiny prozánětlivého IL-6 se v naší studii mezi pacienty s AD a kontrolními seniory nijak významně nelišily. Tento výsledek je rozdílný od předchozích studií, které u pacientů s AD zjistily vyšší hladiny IL-6 oproti kontrolám (Leung et al., 2010) a jejich korelaci s hladinami v cerebrospinální tekutině (Sun et al., 2003). Naše studie tyto výsledky nepotvrdila.

Další prozánětlivý cytokin, který je dáván do souvislosti s AD je TNF- $\alpha$ . Podle studií mají pacienti s AD vyšší koncentrace tohoto cytokinu ve srovnání s kontrolními jedinci (Swardfager et al., 2010). Naše studie zjistila opačný trend – pacientky s AD měly nižší hladiny TNF- $\alpha$  oproti ženám z kontrolního souboru. Mezi muži s AD a zdravými seniory nebyly zjištěny žádné rozdíly v naměřených hladinách. U pacientů s AD byly zjištěny vyšší koncentrace sCD40L. Tyto výsledky jsou v souladu s předchozími studiemi, které došly ke stejnému závěru (Volmar et al., 2009). Podle studií sCD40L může společně se svým

receptorem spouštět produkci  $\beta$ -amyloidních peptidů a může být přímo zapojen do patofyziologie AD (Desideri et al., 2008). Podle některých studií (Yu et al., 2016) by sCD40L mohl být jedním z markerů vhodným pro diagnostiku AD. Tuto myšlenku podporují i výsledky naší studie.

V rámci této studie byly dále měřeny hladiny parametrů, které mají souvislost s neurodegenerací. Mezi tyto parametry patří neurotrofní faktory, růstové faktory, chemokiny a další látky. Tyto markery jsou zapojeny do obranných mechanismů imunitního systému, dějí v centrální nervové soustavě, účastní se synaptogeneze, neurogeneze a podporují přežívání nervových buněk. Tři ze zkoumaných parametrů (BDNF, PDGF-AA, PDGF-AA/BB) musely být ze studie vyřazeny, protože jejich hladiny byly u velké části jedinců v kontrolní skupině pod mezí detekce. Dále byly v rámci panelu pro neurodegenerativní onemocnění stanoveny hladiny adhezivních molekul NCAM, sICAM-1 a VCAM-1. Tyto molekuly jsou biomarkery mikrovaskulárních poruch a studie uvádějí, že u pacientů s AD jsou hladiny ICAM-1 a VCAM-1 v plazmě zvýšené (Ewers et al., 2010). Naše studie nenašla žádné rozdíly v hladinách těchto parametrů mezi sledovanými soubory a pro časnou diagnostiku AD se proto nezdají být vhodnými markery.

Cystatin C je dalším ze stanovených neuroparametrů. Jedná se o inhibitor cysteinových peptidáz, který se účastní procesů imunitního systému, má antivirální a antibakteriální aktivitu a přispívá k obranné odpovědi při poškození mozkové tkáně (Mussap and Plebani, 2004). V souvislosti s AD se uvádí, že má neuroprotektivní roli, protože inhibuje ukládání  $\beta$ -amyloidů (Sastre et al., 2004). Hladiny cystatinu C v cerebrospinální tekutině pozitivně korelují se zvýšenými hladinami tau proteinu (Sundelöf et al., 2010). V plazmě byly zjištěny u pacientů s AD nižší hladiny tohoto parametru (Chuo et al., 2007), jiná studie se zabývala hladinami cystatinu C v séru a žádné rozdíly mezi pacienty s AD a kontrolami nenalezla (Kálmán et al., 2000). Ani v naší studii jsme mezi pacienty s AD a kontrolními seniory žádné významné rozdíly nenašli.

Enolasa 2 (známá také jako neuron-specifická enolasa) je enzym nacházející se v nervových buňkách. Vysoké hladiny enolasy 2 v centrální nervové soustavě mohou sloužit jako marker neuronového poškození. Zvýšené hladiny enolasy 2 v séru a v cerebrospinální tekutině byly zvýšené v případě přítomnosti nervového poškození, např. v případě cévní mozkové příhody (Chekhonin et al., 2002). V souvislosti s AD byly nalezeny zvýšené hladiny enolasy 2 u pacientů s AD v cerebrospinální tekutině (Palumbo et



al., 2008). Podle této studie se jedná o specifický marker pro neuronální poškození u AD, protože hladiny této enolasy byly zvýšené pouze ve skupině pacientů s AD ve srovnání se skupinou jedinců s mírnou kognitivní poruchou nebo fronto-temporální demencí. V naší studii jsme potvrdili tyto výsledky i přes to, že hladiny enolasy 2 byly měřeny v plazmě, a nikoliv v cerebrospinální tekutině. Pacienti s AD měli 3x vyšší hladiny tohoto parametru oproti kontrolnímu souboru a tento marker se zdá být vhodným ukazatelem pro doplnění diagnostických vyšetření.

Posledním vyšetřovaným parametrem spojeným s neurodegenerací byl chemokin RANTES, který hraje důležitou úlohu v navádění leukocytů do CNS za patologických podmínek, zejména v případě výskytu neurozánětu (Ubogu et al., 2006b). U pacientů s AD byla nalezena zvýšená exprese RANTES v cerebrální mikrocirkulaci (Tripathy et al., 2010). V periférii pacientů s AD byla nalezena jak snížená exprese RANTES na úrovni mRNA (Kester et al., 2012), tak i zvýšená koncentrace v plazmě (Marksteiner et al., 2011). Některé studie žádné rozdíly mezi pacienty s AD a kontrolními seniory nenašly (Soares et al., 2009; Julian et al., 2015). V naší studii jsme našli mnohonásobně vyšší hladiny RANTES v plazmě u pacientů s AD oproti kontrolním seniorům.

Změny v hladinách RANTES byly zaznamenány také v souvislosti Parkinsonovou nemocí (Tang et al., 2014) nebo roztroušenou sklerózou (Mori et al., 2016). V případě posttraumatické stresové poruchy, kdy pacienti měli vyšší hladiny RANTES v plazmě ve srovnání s kontrolní skupinou, ženy měly vyšší hladiny než muži (Oglodek et al., 2015). Naše výsledky ukázaly opačný trend – muži mají více jak 2x vyšší hladiny než ženy, ale pouze ve skupině kontrolních seniorů. U pacientů s AD jsme žádné rozdíly mezi pohlavími nenašli. Rozdíl v hladinách mezi pohlavími u kontrolní skupiny pravděpodobně odráží chování RANTES během stárnutí za fyziologických podmínek.

Dále byly změny v hladinách RANTES zaznamenány v souvislosti s obezitou a s přítomností metabolického syndromu (Wu et al., 2007; Ueba et al., 2014). U obézních jedinců byla nalezena zvýšená exprese RANTES v subkutánní tukové tkáni ve srovnání s kontrolním souborem (Baturcam et al., 2014). V naší studii jsme předpokládali, že přítomnost obezity nebo metabolického syndromu bude mít vliv na hladiny RANTES. Nicméně protože jedinci ve sledovaných souborech (pacienti s AD, kontrolní seniory) se z hlediska obezity výrazně nelišili (měřeno na základě hodnot BMI), došli jsme k závěru, že obezita neměla na hladiny RANTES v naší studii žádný vliv. Rozdíly v přítomnosti

metabolického syndromu, respektive procentuální zastoupení jednotlivých složek tvořících metabolický syndrom, byly mezi sledovanými soubory nevýznamné. Některé hodnoty jednotlivých komponent metabolického syndromu byly u pacientů s AD o něco nižší, což bylo pravděpodobně způsobeno častější přítomností medikace u tohoto souboru. Metabolický syndrom tedy v naší studii neměl na plazmatické hladiny RANTES žádný vliv.

V mozkové tkáni se RANTES chová jinak než jen jako typický prozánětlivý cytokin. Je schopný indukovat proliferaci oligodendrocytů a tím přispívat k procesu myelinizace (Kadi et al., 2006). Pokusy *in vitro* ukázaly, že RANTES podporuje migraci ganglií (Bolin et al., 1998), reguluje diferenciaci a zvyšuje proliferaci astrocytů v čelní oblasti lidského mozku (Bakhiet et al., 2001). Má neuroprotektivní roli proti různým neurotoxinům, včetně  $\beta$ -amyloidního peptidu (Ignatov et al., 2006).

Vzhledem k tomu, že obezita ani metabolický syndrom neměly v naší studii na hladiny RANTES vliv, se domníváme, že rozdíly mezi pacienty s AD a kontrolními seniory jsou způsobeny přítomností neurozánětu v mozkové tkáni pacientů s AD. Důvodem by mohla být snaha mozkové tkáně se bránit proti přítomnému zánětu zvýšením produkce RANTES. Ten poté prochází přes hematoencefalickou bariéru do periferní cirkulace. Toto vysvětlení by však potřebovalo další nezávislé studie. Nabízí se otázka, zda se hladiny RANTES nezvyšují přirozeně během procesu stárnutí. Studie Alberta et al. (Albert et al., 2017) naměřila u kontrolních jedinců nižší periferní hladiny RANTES oproti pacientům s poraněním mozku (stejný trend jsme pozorovali i v naší studii). Tyto zdravé mladé kontroly (věk ~30 let) měly 2x nižší hladiny RANTES ve srovnání s našimi seniorskými kontrolami. Z výsledků lze usuzovat, že se hladiny RANTES v periférii zvyšují přirozeně s přibývajícím věkem. Z výše uvedeného vyplývá, že RANTES je potenciálně vhodný marker využitelný v diagnostice AD, nicméně je nutné přihlídnout i k ostatním souvislostem.

### **5.3.3. Shrnutí**

U pacientů s AD jsme oproti kontrolním seniorům našli zvýšené hladiny resistinu, visfatinu a GLP-1. U ostatních adipokinů a inkretinů jsme žádné rozdíly nenalezli. V rámci analýzy cytokinů jsme našli zvýšené hladiny sCD40L u pacientů s AD, a naopak nižší hladiny TNF- $\alpha$  u žen s AD. V hladinách IL-6 nebyly nalezeny žádné rozdíly, ostatní cytokiny nebyly v plazmě měřitelné. U pacientů s AD jsme našli několikanásobně vyšší hladiny chemokinu RANTES v periférii ve srovnání se souborem kontrolních seniorů.

Vzhledem k tomu, že v naší studii nebyl patrný vliv obezity ani metabolického syndromu, je pravděpodobné, že je tento rozdíl způsoben přítomností zánětu v mozkové tkáni pacientů s AD. Vliv pohlaví byl patrný pouze ve skupině kontrolních seniorů (muži měli významně vyšší hladiny než ženy). U pacientů s AD jsme žádný významný rozdíl mezi pohlavími nepozorovali. Dále jsme zjistili trojnásobně vyšší hladiny enolasy 2 u pacientů s AD a zvýšené hladiny MPO u žen s AD. U ostatních parametrů jsme žádné rozdíly mezi pacienty a kontrolními seniory nezaznamenali.

Výsledky naší studie naznačují, že parametry visfatin, resistin, GLP-1, sCD40l, RANTES a enolasa 2 jsou potenciálně vhodné pro využití v diagnostice AD. Ostatní parametry, kterými se tato studie zabývala, mají i v literatuře kontroverzní výsledky a jejich využití v diagnostice AD je sporné a pravděpodobně se pro diagnostiku AD využít nedají.

Část výsledků tohoto oddílu studie byla prezentována na domácí konferenci (Příloha 13).

#### **5.4. Stanovení vybraných cirkulujících steroidních hormonů u pacientů s AD**

Steroidní hormony jsou látky lipofilní povahy, které vznikají procesem steroidogeneze. Prekurzorem pro vznik všech steroidních hormonů je cholesterol. Jedná se o regulátory mnoha fyziologických procesů včetně těch, které probíhají v mozkové tkáni. Zde mají regulační úlohu, ovlivňují plasticitu neuronů, odpověď na stres, učení a paměť. Některé mohou mít neuroprotektivní účinek. V rámci této studie byly stanoveny vybrané steroidy a jejich polární konjugáty.

Dále jsme se zaměřili na enzym SULT2A1 (sulfotransferase family 2A, dehydroepiandrosterone-preferring, member 1), který katalyzuje sulfonaci androgenů a který je exprimován v nadledvinách v *zona reticularis*. Steroidní sulfáty jsou důležitými prekurzory pro další biologicky aktivní steroidy a mají odlišné fyziologické funkce ve srovnání s jejich nekonjugovanými protějšky. Procesem konjugace dochází k významné změně biologické aktivity. Hladiny cirkulujících konjugovaných steroidů jsou mnohem vyšší než jejich nekonjugovaných forem. Pro hodnocení role SULT2A1 v patofyziologii AD jsme analyzovaly steroidy, u kterých převažuje sulfonace katalyzovaná SULT2A1 nad glukuronidací (konjugace -COOH nebo -OH skupiny s kyselinou glukuronovou). Pro odhad aktivity SULT2A1 byly použity poměry steroidních konjugátů a jejich nekonjugovaných protějšků.

### 5.4.1. Výsledky

Ze studie byli vyřazeni pacienti, kteří užívají následující léčiva: kortikoidy, inhibitory vstřebávání serotoninu, hormonální terapie, estrogeny a/nebo nesteroidní antirevmatika. Hladiny některých naměřených steroidních hormonů, u pacientů s AD a kontrolní skupiny seniorů jsou uvedeny v Tab. 13. Zjistili jsme významné rozdíly v poměrech produkt/prekurzor cirkulujících steroidů. Na základě toho můžeme odvozovat významné změny ve steroidogenezi, resp. sníženou či zvýšenou aktivitu klíčových enzymů steroidogeneze u pacientů s AD ve srovnání s kontrolním souborem. Hladiny C21 steroidů byly konzistentně vyšší u pacientů s AD ve srovnání s kontrolním souborem, což ukazuje na zvýšenou aktivitu enzymů v *zona fasciculata* nadledviny u pacientů s AD. Naopak hladiny stabilních  $5\alpha/\beta$  redukovaných katabolitů C19 steroidů, zvláště jejich sulfátů, byly u pacientů s AD konzistentně sníženy. Tento výsledek ukazuje na redukovanou aktivitu enzymů v *zona reticularis* nadledviny a dále sníženou produkci neuroexcitačních  $\Delta^5$  steroidů u pacientů s AD oproti kontrolním seniorům, a to u obou pohlaví. U mužů pak byla pozorována snížená konverze androstendiolu na testosteron. Výsledky této analýzy byly dále hodnoceny ve vztahu s glukózovou tolerancí. Naměřené hodnoty glukózového metabolismu u sledovaných souborů jsou uvedeny v Příloze 3. Vztah mezi steroidním metabolitem a glukózovou tolerancí nebyl v naší studii prokázán.

V rámci odhadování aktivity enzymu SULT2A1 jsme u poměrů konjugovaných/nekonjugovaných C21 steroidů nezjistili žádné významné rozdíly mezi pacienty s AD a kontrolními seniory. Naopak významné rozdíly jsme našli u poměrů konjugovaných/nekonjugovaných C19 steroidů. Pacienti s AD měli významně nižší poměry konjugátů k volným formám steroidů. Studie prokázala sníženou sulfonaci C19 steroidů, tedy nižší aktivitu SULT2A1 enzymu v *zona reticularis* v nadledvině u pacientů s AD. Jednotlivé poměry mezi konjugovanými a nekonjugovanými steroidy jsou uvedeny v Tab. 14.

### 5.4.2. Diskuze

Steroidní látky hrají důležitou úlohu v procesu patofyziologie AD. Jejich souvislost s AD byla již několikrát studována, nicméně metabolomická data jsou omezená. U pacientů s AD byly popsány změny v hladinách neuroaktivních steroidů, ale jejich vztah ke vzniku a rozvoji tohoto onemocnění není dosud příliš jasný.

Studie uvádějí, že  $17\beta$ -estradiol může působit protektivně proti AD, a že jeho pokles v průběhu stárnutí může zvyšovat riziko rozvoje tohoto onemocnění (Pike et al., 2009). U žen s AD byly naměřeny nižší hladiny  $17\beta$ -estradiolu v mozkové tkáni ve srovnání se stejně starými kontrolami (Rosario et al., 2011). Podobně jako v případě estrogenů i testosteron může působit protektivně proti AD. Některé studie uvádějí, že postupná ztráta tohoto hormonu během procesu stárnutí může zvyšovat riziko rozvoje AD (Moffat et al., 2004), jiné studie to však nepotvrdily (Pennanen et al., 2004). Nízké hladiny testosteronu v mozkové tkáni negativně korelují s hladinami  $\beta$ -amyloidu u mužů s ranou fází AD (Rosario et al., 2011). Obecně lze tedy říci, že postupná ztráta pohlavních steroidních hormonů během stárnutí je asociována se zvýšením hladin  $\beta$ -amyloidních peptidů, a tedy i s vyšším rizikem vzniku AD, a to jak u mužů, tak i u žen. V naší studii měli muži s AD sníženou konverzi androstendiolu na testosteron oproti kontrolním seniorům.

SULT2A1 je enzym který je během vývoje exprimován převážně ve fetální zóně nadledvin (Barker et al., 1994), v dospělosti pak v *zona reticularis* nadledvin. V menší míře je exprimován v ledvinách, vaječnicích, prostatě, žaludku nebo v tlustém střevě (Barker et al., 1994; Javitt et al., 2001). SULT2A1 katalyzuje sulfonaci androgenů a jejich  $5\alpha/\beta$ -redukovaných katabolitů, pregnenolonu,  $5\alpha/\beta$ -redukovaných izomerů pregnanolonu, ale také žlučových kyselin (Thomae et al., 2002). Snížený poměr konjugovaných sulfátů (ve vazbě se sulfátem nebo kys. glukuronovou) k nekonjugovaným formám steroidů C/U (*conjugated/unconjugated*) může indikovat sníženou aktivitu SULT2A1.

Výsledky naší studie ukázaly snížení poměr C/U C19 steroidů u pacientů s AD, a tedy asociaci mezi utlumenou sulfonací C19 steroidů v *zona reticularis* a patofyziologií AD. Dřívější studie ukázaly, že s přibývajícím věkem klesá produkce adrenálních androgenů, podobně jako klesá produkce v *zona reticularis* (Dharia and Parker, 2004). Ačkoliv se zdá, že DHEA nemá u lidí vliv na kognitivní funkce u pacientů s AD (Maggio et al., 2015), některé studie ukázaly neuroprotektivní efekt DHEA/DHEAS (Traish et al., 2011). Naše data ukazují podobně jako jiné studie (Aldred and Mecocci, 2010) sníženou aktivitu *zona reticularis* u pacientů s AD.

V naší studii jsme u sledovaných souborů nezjistili významné rozdíly v poměru C/U C21 steroidů. Tento trend by pravděpodobně mohl být způsobený nižší stabilitou C21  $\Delta^5$  steroidů. Tyto steroidy mají vysoké individuální výkyvy v jednotlivých metabolických procesech. Naproti tomu sulfáty C19 steroidů jsou mnohem více stabilní. Poměry C/U

některých steroidů jsou vyšší u mužů oproti ženám, což je pravděpodobně způsobeno vlivem testikulární steroidogeneze. Poměr C/U steroidů nebyl závislý na věku s výjimkou androsteronu. Hodnota BMI neměla na poměr C/U steroidů u našich sledovaných souborů žádný vliv.

#### **5.4.3. Shrnutí**

Naše studie zjistila odlišnou adrenální steroidogenezi u pacientů s AD oproti zdravým seniorům. Výsledky ukázaly asociaci mezi sníženou sulfonací C19 steroidů v *zona reticularis* a patofyziologií AD. Dále ukázaly, že u pacientů s AD se vyskytují vyšší hladiny C21 steroidů, mají tedy zvýšenou činnost *zona fasciculata* nadledviny. Tento výsledek je v souladu s modelem tzv. starší *zony reticularis* nadledviny vyskytující se u pacientů s AD.

Výsledky byly publikovány v zahraničních impaktovaných časopisech (Příloha 2 a Příloha 3).

## 6. Závěr

Předkládaná disertační práce navazuje na výzkumný projekt, který probíhal v Endokrinologickém ústavu v Praze, a na moji diplomovou práci, která se zabývala studiem společných patogenetických faktorů AD a DM2. Disertační práce je zaměřena na výzkum genetických a biochemických změn v souvislosti s AD, jejichž objasnění by přispělo k podhalení pozadí vzniku a rozvoje tohoto onemocnění.

U pacientů s AD se velmi často vyskytuje inzulinová rezistence mozkové tkáně. Otázkou zůstává, zda inzulinová rezistence v CNS má souvislost s periferní inzulinovou rezistencí. Genetická část studie byla zaměřena na některé polymorfismy kandidátních genů pro AD, u kterých byla ukázána souvislost s touto nemocí. U těchto polymorfismů jsme chtěli zjistit, zda mají i souvislost s poruchami glukózového metabolismu. Výsledky studie ukázaly asociaci polymorfismu rs3851179 v genu *PICALM* s gestačním diabetem a s porušenou glukózovou tolerancí. U ostatních polymorfismů nebyla žádná asociace s poruchami glukózového metabolismu prokázána.

Dále byla genetická část práce zaměřena na hledání nových variant v některých exonech vybraných kandidátních genů pro AD a na jejich případnou souvislost s rizikem vzniku a rozvoje tohoto onemocnění. Ve sledovaných souborech nebyla nalezena žádná dosud nepopsaná varianta.

Biochemická část práce byla zaměřena na hledání rozdílů v periferních hladinách vybraných adipokinů, inkretinů, cytokinů a neurodegenerativních parametrů mezi pacienty s AD a zdravými seniory. Výsledky ukázaly zvýšené hladiny resistinu, visfatinu, GLP-1, sCD40L, MPO (pouze u žen) a enolasy-2 u pacientů s AD oproti kontrolním seniorům. Velmi významný rozdíl byl nalezen u chemokinu RANTES, jehož hladiny byly několikanásobně vyšší u pacientů s AD ve srovnání s kontrolním souborem.

Dále byla tato část práce zaměřena na steroidní hormony a na poměry jejich konjugovaných a nekonjugovaných forem. Výsledky ukázaly odlišnou adrenální steroidogenezi u pacientů s AD. Ve srovnání s kontrolními seniory byly u pacientů s AD nalezeny vyšší hladiny C21 steroidů, a naopak nižší hladiny C19 steroidů. Tato data poukazují na zvýšenou činnost *zona fasciculata* nadledvin a zároveň na utlumenou aktivitu *zona reticularis* nadledvin u pacientů s AD.

Tato disertační práce přispěla k poodhalení genetického a biochemického pozadí AD, které je velmi komplikované. Byla nalezena asociace rizikového polymorfismu pro AD se skupinou jedinců, kteří mají poruchu glukózového metabolismu. Dále byla zjištěna souvislost mezi změnami v množství nebo aktivitě některých biochemických parametrů a přítomností AD. Společně s dalšími studiemi, které se problematikou AD zabývají, by tato práce mohla v budoucnu přispět k vytvoření modelu pro lepší diagnostiku AD.



## 7. Literatura

Abella V, Scotece M, Conde J, López V, Lazzaro V, Pino J, Gómez-Reino JJ, Gualillo O. Adipokines, metabolic syndrome and rheumatic diseases. *J Immunol Res*. 2014, 2014:343746.

Adams JD Jr. Alzheimer's disease, ceramide, visfatin and NAD. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2008, 7(6):492-8.

Akdis CA, Akdis M. Mechanisms and treatment of allergic disease in the big picture of regulatory T cells. *J Allergy Clin Immunol*. 2009, 123(4):735-46.

Akdis M, Burgler S, Cramer R, Eiwegger T, Fujita H, Gomez E, Klunker S, Meyer N, O'Mahony L, Palomares O, Rhyner C, Ouaked N, Schaffartzik A, Van De Veen W, Zeller S, Zimmermann M, Akdis CA. Interleukins, from 1 to 37, and interferon- $\gamma$ : receptors, functions, and roles in diseases. *J Allergy Clin Immunol*. 2011, 127(3):701-21.

Albert V, Subramanian A, Agrawal, Bhoi S.K, Pallavi P, Mukhopadhyay AK. RANTES levels in peripheral blood, CSF and contused brain tissue as a marker for outcome in traumatic brain injury (TBI) patients. *BMC Res Notes*. 2017, 10(1):139.

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.

Alonso-Vilatela ME, López-López M, Yescas-Gómez P. Genetics of Alzheimer's disease. *Arch Med Res*. 2012, 43(8):622-31.

Alvarez-de-la-Rosa M, Silva I, Nilsen J, Pérez MM, García-Segura LM, Avila J, Naftolin F. Estradiol prevents neural tau hyperphosphorylation characteristic of Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci*. 2005, 1052:210-24.

Amiri FN, Basirat Z, Omidvar S, Sharbatdaran M, Tilaki KH, Pouramir M. Comparison of the serum iron, ferritin levels and total iron-binding capacity between pregnant women with and without gestational diabetes. *J Nat Sci Biol Med*. 2013, 4(2):302-305.

Ando S, Kobayashi S, Waki H, Kon K, Fukui F, Tadenuma T, Iwamoto M, Takeda Y, Izumiyama N, Watanabe K, Nakamura H. Animal model of dementia induced by entorhinal

- synaptic damage and partial restoration of cognitive deficits by BDNF and carnitine. *J Neurisci R.* 2002, 70(3):519-27.
- Angelucci F, Spalletta G, di Iulio F, Ciaramella A, Salani F, Colantoni L, Varsi AE, Gianni W, Sancesario G, Caltagirone C, Bossù P. Alzheimer's disease (AD) and mild cognitive impairment (MCI) patients are characterized by increased BDNF serum levels. *Curr Alzheimer Res.* 2010, 7(1):15-20.
- Appay V, Rowland-Jones SL. RANTES: a versatile and controversial chemokine. *Trends Immunol.* 2001; 22(2):83-7.
- Azad NA, Al Bugami M, Loy-English I. Gender differences in dementia risk factors. *Gend Med.* 2007, 4(2), 120-9.
- Azizi G., Khannazer N., Mirshafiey A. (2014) The potential role of chemokines in alzheimer's disease pathogenesis. *Am J Alzheimers Dis Other Demen.* 29(5):415-25.
- Bae CS, Song J. The Role of Glucagon-Like Peptide 1 (GLP1) in Type 3 Diabetes: GLP-1 Controls InsulinResistance, Neuroinflammation and Neurogenesis in the Brain. *Int J Mol Sci.* 2017, 18(11).
- Bagyinszky E, Youn YC, An SS, Kim S. The genetics of Alzheimer's disease. *Clin Interv Aging.* 2014, 9:535-51.
- Baig S, Joseph SA, Tayler H, Abraham R, Owen MJ, Williams J, Kehoe PG, Love S. Distribution and expression of picalm in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2010, 69(10):1071-7.
- Bakhiet M, Tjernlund A, Mousa A, Gad A, Strömlund S, Kuziel WA, Seiger A, Andersson J. RANTES promotes growth and survival of human first-trimester forebrain astrocytes. *Nat Cell Biol.* 2001, 3(2):150-7.
- Barker EV, Hume R, Hallas A, Coughtrie WH. Dehydroepiandrosterone sulfotransferase in the developing human fetus: quantitative biochemical and immunological characterization of the hepatic, renal, and adrenal enzymes. *Endocrinology.* 1994, 134(2):982-9.
- Bartzokis G, Tishler TA. MRI evaluation of basal ganglia ferritin iron and neurotoxicity in Alzheimer's and Huntington's disease. *Cell Mol Biol.* 2000, 46(4):821-833.

- Baturcam E, Abubaker J, Tiss A, Abu-Farha M, Khadir A, Al-Ghimlas F, Al-Khairi I, Cherian P, Elkum N, Hammad M, John J, Kavalakatt S, Lehe C, Warsame S, Behbehani K, Dermime S, Dehbi M. Physical exercise reduces the expression of RANTES and its CCR5 receptor in the adipose tissue of obese humans. *Mediators Inflamm.* 2014, 627150.
- Bettens K, Brouwers N, Engelborghs S, Lambert JC, Rogaeva E, Vandenberghe R, Le Bastard N, Pasquier F, Vermeulen S, Van Dongen J, Mattheijssens M, Peeters K, Mayeux R, St George-Hyslop P, Amouyel P, De Deyn PP, Sleegers K, Van Broeckhoven C. Both common variations and rare non-synonymous substitutions and small insertion/deletions in *CLU* are associated with increased Alzheimer risk. *Mol Neurodegener.* 2012, 7:3.
- Binetti G, Signorini S, Squitti R, Alberici A, Benussi L, Cassetta E, Frisoni GB, Barbiero L, Feudatari E, Nicosia F, Testa C, Zanetti O, Gennarelli M, Perani D, Anchisi D, Ghidoni R, Rossini PM. Atypical dementia associated with a novel presenilin-2 mutation. *Ann Neurol.* 2003, 54(6):832-6. ,
- Bolin LM, Murray R, Lukacs NW, Strieter RM, Kunkel SL, Schall TJ, Bacon KB. Primary sensory neurons migrate in response to the chemokine RANTES. *J Neuroimmunol.* 1998, 81(1-2):49-57.
- Brosseron F, Krauthausen M, Kummer M, Heneka MT. Body fluid cytokine levels in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease: a comparative overview. *Mol Neurobiol.* 2014, 50(2):534-44.
- Bu G. Apolipoprotein E and its receptors in Alzheimer's disease: pathways, pathogenesis and therapy. *Nat Rev Neurosci.* 2009, 10(5):333-44.
- Buchhave P, Janciauskiene S, Zetterberg H, Blennow K, Minthon L, Hansson O. Elevated plasma levels of soluble CD40 in incipient Alzheimer's disease. *Neurosci Lett.* 2009, 450(1):56-9.
- Bussy A, Snider BJ, Coble D, Xiong C, Fagan AM, Cruchaga C, Benzinger TLS, Gordon BA, Hassenstab J, Bateman RJ, Morris JC. Effect of apolipoprotein E4 on clinical, neuroimaging, and biomarker measures in noncarrier participants in the Dominantly Inherited Alzheimer Network. *Neurobiol Aging.* 2018, 75:42-50.

- Calingasan NY, Erdely HA, Altar CA. Identification of CD40 ligand in Alzheimer's disease and in animal model of Alzheimer's disease and brain injury. *Neurobiol Aging*. 2002, 23(1):31-9.
- Carrasquillo MM, Belbin O, Hunter TA, Ma L, Bisceglia GD, Zou F, Crook JE, Pankratz VS, Dickson DW, Graff-Radford NR, Petersen RC, Morgan K, Younkin SG. Replication of CLU, CR1, and PICALM associations with Alzheimer disease. *Arch Neurol*. 2010, 67(8):961-4.
- Carta MG, Bhat KM, Preti A. GABAergic neuroactive steroids: a new frontier in bipolar disorders? *Behav Brain Funct*. 2012, 8:61.
- Cojocaru IM, Cojocaru M, Miu G, Sapira V. Study of interleukin-6 production in Alzheimer's disease. *Rom J Intern Med*. 2011, 49(1):55-8.
- Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, Roses AD, Haines JL, Pericak-Vance MA. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science*. 1993, 261(5123):921-3
- Craft S. The role of metabolic disorders in Alzheimer disease and vascular dementia: two roads converged. *Arch Neurol*. 2009, 66(3):300-5.
- Craft S, Watson GS. Insulin and neurodegenerative disease: shared and specific mechanisms. *Lancet Neurol*. 2004, 3(3):169-78.
- Crehan H, Hardy J, Pocock J. Blockage of CR1 prevents activation of rodent microglia. *Neurobiol Dis*. 2013, 54:139-49.
- Crespo AC, Silva B, Marques L, Marcelino E, Maruta C, Costa S, Timoteo A, Vilares A, Couto FS, Faustino P, Correia AP, Vardelho A, Porto G, Guerreiro M, Herrero A, Costa C, de Mendoca A, Costa L, Martins M. Genetic and biochemical markers in patients with Alzheimer's disease support a concentrated systemic iron homeostasis dysregulation. *Neurobiol Aging*. 2014, 35(4):777-785.
- Cruts M, Theuns J, Van Broeckhoven C. Locus-specific mutation databases for neurodegenerative brain diseases. *Hum Mutat*. 2012, 33(9):1340-4.
- de la Monte SM, Wands JR. Alzheimer's disease is type 3 diabetes – evidence reviewed. *J Diabetes Sci Technol*. 2008, 2(6):1101-13.

- Demirci S, Aynalı A, Demirci K, Demirci S, Arıdoğan BC. The Serum Levels of Resistin and Its Relationship with Other Proinflammatory Cytokines in Patients with Alzheimer's Disease. *Clin Psychopharmacol Neurosci*. 2017, 15(1):59-63.
- Desideri G, Cipollone F, Necozone S, Marini C, Lechiara MC, Taglieri G, Zuliani G, Fellin R, Mezzetti A, di Orio F, Ferri C. Enhanced soluble CD40 ligand and Alzheimer's disease: evidence of a possible pathogenetic role. *Neurobiol Aging*. 2008, 29(3):348-56.
- Dharia S, Parker CR Jr. Adrenal androgens and aging. *Semin Reprod Med*. 2004, 22(4):361-8.
- Dukic L, Simundic AM, Martinic-Popovic I, Kackov S, Diamandis A, Begcevic I, Diamandis EP. The role of human kallikrein 6, clusterin and adiponectin as potential blood biomarkers of dementia. *Clin Biochem*. 2016, 49(3):213-8.
- Ewers M, Mielke MM, Hampel H. Blood-based biomarkers of microvascular pathology in Alzheimer's disease. *Exp Gerontol*. 2010, 45(1), 75-9.
- Ferrari R, Moreno JH, Minhajuddin AT, O'Bryant SE, Reisch JS, Barber RC, Momeni P. Implication of common and disease specific variants in CLU, CR1, and PICALM. *Neurobiol Aging*. 2012, 33(8):1846.e7-18.
- Ferri CP, Prince M, Brayne C, Brodaty H, Fratiglioni L, Ganguli M, Hall K, Hasegawa K, Hendrie H, Huang Y, Jorm A, Mathers C, Menezes PR, Rimmer E, Sczuzfca M. Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *Lancet*. 2005, 366(9503):2112-7.
- Fetler L, Amigorena S. Neuroscience. Brain under surveillance: the microglia patrol. *Science*. 2005, 309(5733):392-3.
- Fewlass DC, Noboa K, Pi-Sunyer FX, Johnston JM, Yan SD, Tezapsidis N. Obesity-related leptin regulates Alzheimer's Abeta. *FASEB J*. 2004, 18(15):1870-8.
- Ford ES, Giles WH, Dietz WH. Prevalence of the metabolic syndrome among US adults: findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey. *JAMA*. 2002, 287(3):356-9.
- Fukuhara A, Matsuda M, Nishizawa M, Segawa K, Tanaka M, Kishimoto K, Matsuki Y, Murakami M, Ichisaka T, Murakami H, Watanabe E, Takagi T, Akiyoshi M, Ohtsubo T, Kihara S, Yamashita S, Makishima M, Funahashi T, Yamanaka S, Hiramatsu R, Matsuzawa

- Y, Shimomura I. Visfatin: a protein secreted by visceral fat that mimics the effects of insulin. *Science*. 2005, 307(5708):426-30.
- Garzon D, Yu G, Fahnstock M. A new brain-derived neurotrophic factor transcript and decrease in brain-derived neurotrophic factor transcripts 1, 2 and 3 in Alzheimer's disease parietal cortex. *J Neurochem*. 2002, 82(5):1058-64.
- Gaspari S, Marcovecchio ML, Breda L, Chiarelli F. Growth in juvenile idiopathic arthritis: the role of inflammation. *Clin Exp Rheumatol*. 2011, 29(1):104-10.
- Greco SJ, Sarkar S, Johnston JM, Tezapsidis N. Leptin regulates tau phosphorylation and amyloid through AMPK in neuronal cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009, 380(1):98-104.
- Green KN, Billings LM, Roozendaal B, McGaugh JL, LaFerla FM. Glucocorticoids increase amyloid-beta and tau pathology in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci*. 2006, 26(35):9047-56.
- Guerreiro RJ, Beck J, Gibbs JR, Santana I, Rossor MN, Schott JM, Nalls MA, Ribeiro H, Santiago B, Fox NC, Oliveira C, Collinge J, Mead S, Singleton A, Hardy J. Genetic variability in CLU and its association with Alzheimer's disease. *PLoS One*. 2010, 5(3):e9510.
- Hampl R, Bicíková M. Neuroimmunomodulatory steroids in Alzheimer dementia. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2010, 119(3-5):97-104.
- Han W, Li C. Linking type 2 diabetes and Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010, 107(15):6557-8.
- Harold D, Abraham R, Hollingworth P, Sims R, Gerrish A, Hamshere ML, Pahwa JS, Moskvina V, Dowzell K, Williams A, Jones N, Thomas C, Stretton A, Morgan AR, Lovestone S, Powell J, Proitsi P, Lupton MK, Brayne C, Rubinsztein DC, Gill M, Lawlor B, Lynch A, Morgan K, Brown KS, Passmore PA, Craig D, McGuinness B, Todd S, Holmes C, Mann D, Smith AD, Love S, Kehoe PG, Hardy J, Mead S, Fox N, Rossor M, Collinge J, Maier W, Jessen F, Schürmann B, Heun R, van den Bussche H, Heuser I, Kornhuber J, Wiltfang J, Dichgans M, Frölich L, Hampel H, Hüll M, Rujescu D, Goate AM, Kauwe JS, Cruchaga C, Nowotny P, Morris JC, Mayo K, Sleegers K, Bettens K, Engelborghs S, De Deyn PP, Van Broeckhoven C, Livingston G, Bass NJ, Gurling H, McQuillin A, Gwilliam

R, Deloukas P, Al-Chalabi A, Shaw CE, Tsolaki M, Singleton AB, Guerreiro R, Mühleisen TW, Nöthen MM, Moebus S, Jöckel KH, Klopp N, Wichmann HE, Carrasquillo MM, Pankratz VS, Younkin SG, Holmans PA, O'Donovan M, Owen MJ, Williams J. Genome-wide association study identifies variants at CLU and PICALM associated with Alzheimer's disease. *Nat Genet.* 2009, 41(10):1088-93.

Herman JP, Seroogy K. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, glucocorticoids, and neurologic disease. *Neurol Clin.* 2006, 24(3):461-81.

Hu X, Pickering E, Liu YC, Hall S, Fournier H, Katz E, Dechairo B, John S, Van Eerdewegh P, Soares H. Meta-analysis for genome-wide association study identifies multiple variants at the BIN1 locus associated with late-onset Alzheimer's disease. *PLoS One.* 2011, 6(2):e16616.

Chapuis J, Hansmannel F, Gistelinc M, Mounier A, Van Cauwenberghe C, Kolen KV, Geller F, Sottejeau Y, Harold D, Dourlen P, Grenier-Boley B, Kamatani Y, Delepine B, Demiautte F, Zelenika D, Zommer N, Hamdane M, Bellenguez C, Dartigues JF, Hauw JJ, Letronne F, Ayril AM, Slegers K, Schellens A, Broeck LV, Engelborghs S, De Deyn PP, Vandenberghe R, O'Donovan M, Owen M, Epelbaum J, Mercken M, Karran E, Bantscheff M, Drewes G, Joberty G, Champion D, Octave JN, Berr C, Lathrop M, Callaerts P, Mann D, Williams J, Buée L, Dewachter I, Van Broeckhoven C, Amouyel P, Moechars D, Dermaut B, Lambert JC; GERAD consortium. Increased expression of BIN1 mediates Alzheimer's genetic risk by modulating tau pathology. *Mol Psychiatry.* 2013, 18(11):1225-34.

Charalampopoulos I, Alexaki VI, Tsatsanis C, Minas V, Dermitzaki E, Lasaridis I, Vardouli L, Stournaras C, Margioris AN, Castanas E, Gravanis A. Neurosteroids as endogenous inhibitors of neuronal cell apoptosis in aging. *Ann N Y Acad Sci.* 2006, 1088:139-52.

Chekhonin VP, Zhirkov YA, Belyaeva IA, Ryabukhin IA, Gurina OI, Dmitriyeva TB. Serum time course of two brain-specific proteins, alpha(1) brain globulin and neuron-specific enolase, in tick-borne encephalitis and Lyme disease. *Clin Chim Acta.* 2002, 320(1-2):117-25.

Chen K, Huang J, Gong W, Zhang L, Yu P, Wang JM. CD40/CD40L dyad in the inflammatory and immune responses in the central nervous system. *Cell Mol Immunol.* 2006a, 3(3):163-9.

- Chen MP, Chung FM, Chang DM, Tsai JC, Huang HF, Shin SJ, Lee YJ. Elevated plasma level of visfatin/pre-B cell colony-enhancing factor in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006b, 91(1):295-9.
- Cherrier MM. Testosterone effects on cognition in health and disease. *Front Horm Res.* 2009, 37:150-62
- Chou SY, Ajoy R, Changou CA, Hsieh YT, Wang YK, Hoffer B. CCL5/RANTES contributes to hypothalamic insulin signaling for systemic insulin responsiveness through CCR5. *Sci Rep.* 2016, 29;6,37659.
- Choukair D, Hügel U, Sander A, Uhlmann L, Tönshoff B. Inhibition of IGF-I-related intracellular signaling pathways by proinflammatory cytokines in growth plate chondrocytes. *Pediatr Res.* 2014, 76(3):245-51.
- Chuo LJ, Sheu WH, Pai MC, Kuo YM. Genotype and plasma concentration of cystatin C in patients with late-onset Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord.* 2007, 23(4):251-7.
- Ignatov A, Robert J, Gregory-Evans C, Schaller HC. RANTES stimulates Ca<sup>2+</sup> mobilization and inositol trisphosphate (IP<sub>3</sub>) formation in cells transfected with G protein-coupled receptor 75. *Br J Pharmacol.* 2006, 149(5):490-7.
- Javitt NB, Lee YC, Shimizu C, Fuda H, Strott CA. Cholesterol and hydroxycholesterol sulfotransferases: identification, distinction from dehydroepiandrosterone sulfotransferase, and differential tissue expression. *Endocrinology.* 2001, 142(7):2978-84.
- Jones SE, Jomary C. Clusterin. *Int J Biochem Cell Biol.* 2002, 34(5):427-31
- Julian A, Dugast E, Ragot S, Krolak-Salmon P, Berrut G, Dantoine T, Hommet C, Hanon O, Page G, Paccalin M. There is no correlation between peripheral inflammation and cognitive status at diagnosis in Alzheimer's disease. *Aging Clin Exp Res.* 2015, 27(5):589-94.
- Jun G, Naj AC, Beecham GW, Wang LS, Buross J, Gallins PJ, Buxbaum JD, Ertekin-Taner N, Fallin MD, Friedland R, Inzelberg R, Kramer P, Rogava E, St George-Hyslop P; Alzheimer's Disease Genetics Consortium, Cantwell LB, Dombroski BA, Saykin AJ, Reiman EM, Bennett DA, Morris JC, Lunetta KL, Martin ER, Montine TJ, Goate AM,



Blacker D, Tsuang DW, Beekly D, Cupples LA, Hakonarson H, Kukull W, Foroud TM, Haines J, Mayeux R, Farrer LA, Pericak-Vance MA, Schellenberg GD. Meta-analysis confirms CR1, CLU, and PICALM as Alzheimer disease risk loci and reveals interactions with APOE genotypes. *Arch Neurol*. 2010, 67(12):1473-84.

Kadi L, Selvaraju R, de Lys P, Proudfoot AE, Wells TN, Boschert U. Differential effects of chemokines on oligodendrocyte precursor proliferation and myelin formation in vitro. *J Neuroimmunol*. 2006, 174(1-2):133-46.

Kálmán J, Márky-Zay J, Juhász A, Sántha A, Dux L, Janka Z. Serum and cerebrospinal fluid cystatin C levels in vascular and Alzheimer's dementia. *Acta Neurol Scand*. 2000, 101(4):279-82.

Kamboh MI, Demirci FY, Wang X, Minster RL, Carrasquillo MM, Pankratz VS, Younkin SG, Saykin AJ; Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative, Jun G, Baldwin C, Logue MW, Buross J, Farrer L, Pericak-Vance MA, Haines JL, Sweet RA, Ganguli M, Feingold E, Dekosky ST, Lopez OL, Barmada MM. Genome-wide association study of Alzheimer's disease. *Transl Psychiatry*. 2012, 2:e117.

Kamboh MI, Minster RL, Demirci FY, Ganguli M, Dekosky ST, Lopez OL, Barmada MM. Association of CLU and PICALM variants with Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2010, 33(3):518-21.

Kancheva R, Hill M, Novák Z, Chrastina J, Kancheva L, Stárka L. Neuroactive steroids in periphery and cerebrospinal fluid. *Neuroscience*. 2011, 191:22-7.

Karch CM, Jeng AT, Nowotny P, Cady J, Cruchaga C, Goate AM. Expression of novel Alzheimer's disease risk genes in control and Alzheimer's disease brains. *PLoS One*. 2012, 7(11):e50976.

Kazlauskas A. PDGFs and their receptors. *Gene*. 2017, 614:1-7.

Kester MI, van der Flier WM, Visser A, Blankenstein MA, Scheltens P, Oudejans CB. Decreased mRNA expression of CCL5 [RANTES] in Alzheimer's disease blood samples. *Clin Chem Lab Med*. 2012, 50(1):61-5.

- Khemka VK, Bagchi D, Bandyopadhyay K, Bir A, Chattopadhyay M, Biswas A, Basu D, Chakrabarti S. Altered serum levels of adipokines and insulin in probable Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 2014, 41(2):525-33.
- Kiliaan AJ, Arnolussen IA, Gustafson DR. Adipokines: a link between obesity and dementia? *Lancet Neurol.* 2014, 13(9):913-23.
- Kim J, Basak JM, Holtzman DM. The role of apolipoprotein E in Alzheimer's disease. *Neuron.* 2009, 63(3):287-303.
- Klebig ML, Wall MD, Potter MD, Rowe EL, Carpenter DA, Rinchik EM. Mutations in the clathrin-assembly gene *Picalm* are responsible for the hematopoietic and iron metabolism in *fit1* mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003, 100(14):8360-5.
- Koubková L, Vojtěšek B, Vyzula R. Sekvenování nové generace a možnosti jeho využití v onkologické praxi. *Klin Onkol.* 2014, 27 Suppl 1:S61-8.
- Kunugi H, Ueki A, Otsuka M, Isse K, Hirasawa H, Kato N, Nabika T, Kobayashi S, Nanko S. A novel polymorphism of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene associated with late-onset Alzheimer's disease. *Mol Psychiatry.* 2001, 6(1):83-6.
- Laske C, Stransky E, Leyhe T, Eschweiler GW, Maetzler W, Wittorf A, Soekadar S, Richartz E, Koehler N, Bartels M, Buchkremer G, Schott K. BDNF serum and CSF concentrations in Alzheimer's disease, normal pressure hydrocephalus and healthy controls. *J Psychiatr Res.* 2007, 41(5):387-94.
- Leung R, Proitsi P, Simmons A, Lunnon K, Güntert A, Kronenberg D, Pritchard M, Tsolaki M, Mecocci P, Kloszewska I, Vellas B, Soininen H, Wahlund LO, Lovestone S. Inflammatory proteins in plasma are associated with severity of Alzheimer's disease. *PLoS One.* 2013, 8(6):e64971.
- Li H, Wetten S, Li L, St Jean PL, Upmanyu R, Surh L, Hosford D, Barnes MR, Briley JD, Borrie M, Coletta N, Delisle R, Dhalla D, Ehm MG, Feldman HH, Fornazzari L, Gauthier S, Goodgame N, Guzman D, Hammond S, Hollingworth P, Hsiung GY, Johnson J, Kelly DD, Keren R, Kertesz A, King KS, Lovestone S, Loy-English I, Matthews PM, Owen MJ, Plumpton M, Pryse-Phillips W, Prinjha RK, Richardson JC, Saunders A, Slater AJ, St George-Hyslop PH, Stinnett SW, Swartz JE, Taylor RL, Wherrett J, Williams J, Yarnall DP, Gibson RA, Irizarry MC, Middleton LT, Roses AD. Candidate single-nucleotide

polymorphisms from a genomewide association study of Alzheimer disease. *Arch Neurol*. 2008, 65(1):45-53.

Li Y, Duffy KB, Ottinger MA, Ray B, Bailey JA, Holloway HW, Tweedie D, Perry T, Mattson MP, Kapogiannis D, Sambamurti K, Lahiri DK, Greig NH. GLP-1 receptor stimulation reduces amyloid-beta peptide accumulation and cytotoxicity in cellular and animal models of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*. 2010b, 19(4):1205-19.

Li J, Wang JP, Ghiran I, Cerny A, Szalai AJ, Briles DE, Finberg RW. Complement receptor 1 expression on mouse erythrocytes mediates clearance of *Streptococcus pneumoniae* by immune adherence. *Infect Immun*. 2010a, 78(7):3129-35.

Lin SY, Cui H, Yusta B, Belsham DD. IGF-I signaling prevents dehydroepiandrosterone (DHEA)-induced apoptosis in hypothalamic neurons. *Mol Cell Endocrinol*. 2004, 214(1-2), 127-35.

Liu S, Wu H, Xue G, Ma X, Wu J, Qin Y, Hou Y. Metabolic alteration of neuroactive steroids and protective effect of progesterone in Alzheimer's disease-like rats. *Neural Regen Res*. 2013, 8(30):2800-10.

Liu XA, Zhu LQ, Zhang Q, Shi HR, Wang SH, Wang Q, Wang JZ. Estradiol attenuates tau hyperphosphorylation induced by upregulation of protein kinase-A. *Neurochem Res*. 2008, 33(9):1811-20.

Liu C., Cui G., Zhu M., Kang X., Guo H. Neuroinflammation in Alzheimer's disease: chemokines produced by astrocytes and chemokine receptors. *Int J Clin Exp Pathol*. 2014, 7(12):8342-55.

Lumpkins K, Bochicchio GV, Zagol B, Ulloa K, Simard JM, Schaub S, Meyer W, Scalea T. Plasma levels of the beta chemokine regulated upon activation, normal T cell expressed, and secreted (RANTES) correlate with severe brain injury. *J Trauma*. 2008, 64(2):358-61.

Lynch AM, Walsh C, Delaney A, Nolan Y, Campbell VA, Lynch MA. Lipopolysaccharide-induced increase in signalling in hippocampus is abrogated by IL-10--a role for IL-1 beta? *J Neurochem*. 2004;88(3):635-646.

- Ma XY, Yu JT, Tan MS, Sun FR, Miao D, Tan L. Missense variants in CR1 are associated with increased risk of Alzheimer' disease in Han Chinese. *Neurobiol Aging*. 2014, 35(2):443.e17-21.
- Maeda S, Sahara N, Saito Y, Murayama M, Yoshiike Y, Kim H, Miyasaka T, Murayama S, Ikai A, Takashima A. Granular tau oligomers as intermediates of tau filaments. *Biochemistry*. 2007, 46(12):3856-61.
- Maggio M, De Vita F, Fisichella A, Colizzi E, Provenzano S, Lauretani F, Luci M, Ceresini G, Dall'Aglio E, Caffarra P, Valenti G, Ceda GP. DHEA and cognitive function in the elderly. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2015, 145:281-92
- Marksteiner J, Kemmler G, Weiss EM, Knaus G, Ullrich C, Mechtcheriakov S, Oberbauer H, Auffinger S, Hinterhölzl J, Hinterhuber H, Humpel C. Five out of 16 plasma signaling proteins are enhanced in plasma of patients with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2011, 32(3):539-40.
- Martin L, Latypova X, Wilson CM, Magnaudeix A, Perrin ML, Yardin C, Terro F. Tau protein kinases: involvement in Alzheimer's disease. *Ageing Res Rev*. 2013, 12(1):289-309.
- Masoodi TA, Al Shammari SA, Al-Muammar MN, Alhamdan AA. Screening and Evaluation of Deleterious SNPs in APOE Gene of Alzheimer's Disease. *Neurol Res Int*. 2012, 2012:480609.
- Mátl O, Mátlová M, Holmerová I. *Zpráva o stavu demence 2016*. 1. vyd, Praha: ČAS, 2016. ISBN 978-80-86541-50-1.
- Mawuenyega KG, Sigurdson W, Ovod V, Munsell L, Kasten T, Morris JC, Yarasheski KE, Bateman RJ. Decreased clearance of CNS beta-amyloid in Alzheimer's disease. *Science*. 2010, 330(6012):1774.
- McClellan PL, Parthasarathy V, Faivre E, Hölscher C. The diabetes drug liraglutide prevents degenerative processes in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci*. 2011, 31(17):6587-94.
- McKay GJ, Silvestri G, Chakravarthy U, Dasari S, Fritsche LG, Weber BH, Keilhauer CN, Klein ML, Francis PJ, Klaver CC, Vingerling JR, Ho L, De Jong PT, Dean M, Sawitzke J, Baird PN, Guymer RH, Stambolian D, Orlin A, Seddon JM, Peter I, Wright AF, Hayward

- C, Lotery AJ, Ennis S, Gorin MB, Weeks DE, Kuo CL, Hingorani AD, Sofat R, Cipriani V, Swaroop A, Othman M, Kanda A, Chen W, Abecasis GR, Yates JR, Webster AR, Moore AT, Seland JH, Rahu M, Soubrane G, Tomazzoli L, Topouzis F, Vioque J, Young IS, Fletcher AE, Patterson CC. Variations in apolipoprotein E frequency with age in a pooled analysis of a large group of olderpeople. *Am J Epidemiol*. 2011, 173(12):1357-64.
- Meiler F, Zumkehr J, Klunker S, Rückert B, Akdis CA, Akdis M. In vivo switch to IL-10-secreting T regulatory cells in high dose allergen exposure. *J Exp Med*. 2008, 205(12):2887-98.
- Mellon SH, Griffin LD. Neurosteroids: biochemistry and clinical significance. *Trends Endocrinol Metab*. 2002, 13(1):35-43.
- Mercer JL, Argus JP, Crabtree DM, Keenan MM, Wilks MQ, Chi JT, Bensinger SJ, Lavau CP, Wechsler DS. Modulation of PICALM levels perturbs cellular cholesterol homeostasis. *PLoS ONE*. 2015, 10(6):e0129776.
- Mi W, Pawlik M, Sastre M, Jung SS, Radvinsky DS, Klein AM, Sommer J, Schmidt SD, Nixon RA, Mathews PM, Levy E. Cystatin C inhibits amyloid-beta deposition in Alzheimer's disease mouse models. *Nat Genet*. 2007, 39(12):1440-2.
- Moffat SD, Zonderman AB, Metter EJ, Kawas C, Blackman MR, Harman SM, Resnick SM. Free testosterone and risk for Alzheimer disease in older men. *Neurology*. 2004, 62(2):188-93.
- Mori F, Niscico R, Nicoletti CG, Zagaglia S, Mandolesi G, Piccinin S, Martino G, Finardi A, Rossini PM, Marfia GA, Furian R, Centonze D. RANTES correlates with inflammatory activity and synaptic excitability in multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2016, 22:1404-12.
- Morley JE, Farr SA . The role of amyloid-beta in the regulation of memory. *Biochem Pharmacol*. 2014, 88(4):479-85.
- Mussap M, Plebani M. Biochemistry and clinical role of human cystatin C. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2004, 41(5-6):467-550.
- Ogłodek E. A., Szota A. M., Moś D. M., Araszkievicz A., Szromek A. R. (Serum concentrations of chemokines (CCL-5 and CXCL-12), chemokine receptors (CCR-5 and

- CXCR-4), and IL-6 in patients with posttraumatic stress disorder and avoidant personality disorder. *Pharmacol Rep.* 2015, 67(6):1251-8.
- Oomura Y, Hori N, Shiraishi T, Fukunaga K, Takeda H, Tsuji M, Matsumiya T, Ishibashi M, Aou S, Li XL, Kohno D, Uramura K, Sougawa H, Yada T, Wayner MJ, Sasaki K. Leptin facilitates learning and memory performance and enhances hippocampal CA1 long-term potentiation and CaMK II phosphorylation in rats. *Peptides.* 2006, 27(11):2738-49.
- Palumbo B, Siepi D, Sabalich I, Tranfaglia C, Parnetti L. Cerebrospinal fluid neuron-specific enolase: a further marker of Alzheimer's disease? *Funct Neurol.* 2008, 23(2):93-6.
- Pagani S, Meazza C, Travaglini P, Moretta A, Bozzola M. Effect of growth hormone therapy on the proinflammatory cytokine profile in growth hormone-deficient children. *Eur Cytokine Netw.* 2005, 16(1):65-9.
- Pan W, Banks WA, Fasold MB, Bluth J, Kastin AJ. Transport of brain-derived neurotrophic factor across the blood-brain barrier. *Neuropharmacology.* 1998, 37(12):1553-61.
- Pennanen C, Laakso MP, Kivipelto M, Ramberg J, Soininen H. Serum testosterone levels in males with Alzheimer's disease. *J Neuroendocrinol.* 2004, 16(2):95-8.
- Perry VH. Contribution of systemic inflammation to chronic neurodegeneration. *Acta Neuropathol.* 2010, 120(3):277-86.
- Pezet S, Malcangio M. Brain-derived neurotrophic factor as a drug target for CNS disorders. *Expert Opin Ther Targets.* 2004, 8(5):391-9.
- Pike CJ, Carroll JC, Rosario ER, Barron AM. Protective actions of sex steroid hormones in Alzheimer's disease. *Front Neuroendocrinol.* 2009, 30(2):239-58.
- Pimplikar SW. Reassessing the amyloid cascade hypothesis of Alzheimer's disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2009, 41(6):1261-8.
- Pláteník J, Fišar Z, Buchal R, Jirák R, Kitzlerová E, Zvěřová M, Raboch J. GSK3 $\beta$ , CREB, and BDNF in peripheral blood of patients with Alzheimer's disease and depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2014, 50:83-93.
- Poduslo JF, Curran GL, Wengenack TM, Malester B, Duff K. Permeability of proteins at the blood-brain barrier in the normal adult mouse and double transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis.* 2001, 8(4):555-67.

- Prokic I, Cowling BS, Laporte J. Amphiphysin 2 (BIN1) in physiology and diseases. *J Mol Med*. 2014, 92(5):453-63.
- Qian L, Block ML, Wei SJ, Lin CF, Reece J, Pang H, et al. Interleukin-10 protects lipopolysaccharide-induced neurotoxicity in primary midbrain cultures by inhibiting the function of NADPH oxidase. *J Pharmacol Exp Ther*. 2006;319(1):44–52.
- Ramirez-Bermudez J. Alzheimer's disease: Critical notes on the history of medical concept. *Arch Med Res*. 2012, 43(8):595-9.
- Rao JS, Kellom M, Kim HW, Rapoport SI, Reese EA. Neuroinflammation and synaptic loss. *Neurochem Res*. 2012, 37(5):903-10.
- Reitz Ch, Brayne C, Mayeux R. Epidemiology of Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurol*. 2011, 7(3):137-152.
- Ribatti D. Interleukins as modulators of angiogenesis and anti-angiogenesis in tumors. *Cytokine*. 2018, S1043-4666(18)30410-1.
- Richwine AF, Sparkman NL, Dilger RN, Buchanan JB, Johnson RW. Cognitive deficits in interleukin-10-deficient mice after peripheral injection of lipopolysaccharide. *Brain Behav Immun*. 2009;23(6):794–802.
- Romacho T, Villalobos LA, Cercas E, Carraro R, Sánchez-Ferrer CF, Peiró C. Visfatin as a novel mediator released by inflamed human endothelial cells. *PLoS One*. 2013, 8(10):e78283.
- Rosario ER, Chang L, Head EH, Stanczyk FZ, Pike CJ. Brain levels of sex steroid hormones in men and women during normal aging and in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2011, 32(4):604-13.
- Rubio-Perez JM, Morillas-Ruiz JM. A review: inflammatory proces in Alzheimer's disease, role of cytokines. *ScientificWorldJournal*. 2012, 2012:756357.
- Sastre M, Calero M, Pawlik M, Mathews PM, Kumar A, Danilov V, Schmidt SD, Nixon RA, Frangione B, Levy E. Binding of cystatin C to Alzheimer's amyloid beta inhibits in vitro amyloid fibril formation. *Neurobiol Aging*. 2004, 25(8):1033-43.

- Schmid A, Hochberg A, Berghoff M, Schlegel J, Karrasch T, Kaps M, Schäffler A. Quantification and regulation of adipsin in human cerebrospinal fluid (CSF). *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2016, 84(2):194-202.
- Scotland PB, Heath JL, Conway AE, Porter NB, Armstrong MB, Walker JA, Klebig ML, Lavau CP, Wechsler DS. The PICALM protein plays a key role in iron homeostasis and cell proliferation. *PLoS ONE*. 2012, 7(8):e442252.
- Shoelson SE, Herrero L, Naaz A. Obesity, inflammation, and insulin resistance. *Gastroenterology*. 2007, 132(6):2169-80.
- Sil S, Periyasamy P, Thangaraj A, Chivero ET, Buch S. PDGF/PDGFR axis in the neural systems. *Mol Aspects Med*. 2018, S0098-2997(17)30133-4.
- Soares HD, Chen Y, Sabbagh M, Rohrer A, Schrijvers E, Breteler M. Identifying early markers of Alzheimer's disease using quantitative multiplex proteomic immunoassay panels. *Ann NY Acad Sci*. 2009, 1180:56-67.
- Song WC, Sarrias MR, Lambris JD. Complement and innate immunity. *Immunopharmacology*. 2000, 49(1-2):187-98.
- Sorrentino P, Iuliano A, Polverino A, Jacini F, Sorrentino G. The dark sides of amyloid in Alzheimer's disease pathogenesis. *FEBS Lett*. 2014, 588(5):641-52.
- Stuart M. J., Baune B. T. Chemokines and chemokine receptors in mood disorders, schizophrenia, and cognitive impairment: A systematic review of biomarker studies. *Neurosci Biobehav Rev*. 2014, 42:93-115.
- Sun YX, Minthon L, Wallmark A, Warkentin S, Blennow K, Janciauskiene S. Inflammatory markers in matched plasma and cerebrospinal fluid from patients with Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 2003, 16(3):136-44.
- Sundelöf J, Sundström J, Hansson O, Eriksson-Jönhagen M, Giedraitis V, Larsson A, Degerman-Gunnarsson M, Ingelsson M, Minthon L, Blennow K, Kilander L, Basun H, Lannfelt L. Cystatin C levels are positively correlated with both Abeta42 and tau levels in cerebrospinal fluid in persons with Alzheimer's disease, mild cognitive impairment, and healthy controls. *J Alzheimers Dis*. 2010, 21(2):471-8.



Swardfager W, Lanctôt K, Rothenburg L, Wong A, Cappell J, Herrmann N. A meta-analysis of cytokines in Alzheimer's disease. *Biol Psychiatry*. 2010, 68(10):930-41

Szalecki M, Malinowska A, Prokop-Piotrkowska M, Janas R. Interactions between the growth hormone and cytokines - A review. *Adv Med Sci*. 2018, 63(2):285-289.

Takeda S, Sato N, Uchio-Yamada K, Sawada K, Kunieda T, Takeuchi D, Kurinami H, Shinohara M, Rakugi H, Morishita R. Diabetes-accelerated memory dysfunction via cerebrovascular inflammation and Abeta deposition in an Alzheimer mouse model with diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010, 107(15):7036-41.

Takei K, Haucke V. Clathrin-mediated endocytosis: membrane factors pull the trigger. *Trends Cell Biol*. 2001, 11(9):385-91.

Tamagno E, Guglielmotto M, Bardini P, Santoro G, Davit A, Di Simone D, Danni O, Tabaton M. Dehydroepiandrosterone reduces expression and activity of BACE in NT2 neurons exposed to oxidative stress. *Neurobiol Dis*. 2003, 14(2):291-301.

Tan MS, Yu JT, Tan L. Bridging integrator 1 (BIN1): form, function, and Alzheimer's disease. *Trends Mol Med*. 2013, 19(10):594-603.

Tan MS, Yu JT, Jiang T, Zhu XC, Guan HS, Tan L. Genetic variation in BIN1 gene and Alzheimer's disease risk in Han Chinese individuals. *Neurobiol Aging*. 2014, 35(7):1781.

Tan L, Wang HF, Tan MS, Tan CC, Zhu XC, Miao D, Yu WJ, Jiang T, Tan L, Yu JT. Effect of CLU genetic variants on cerebrospinal fluid and neuroimaging markers in health, mildcognitive impairment and Alzheimer's disease cohorts. *Sci Rep*. 2016, 6:26027.

Tang P, Chong L, Li X, Liu Y, Liu P, Hou C, Li R. Correlation between serum RANTES levels and the severity of Parkinson's disease. *Oxid Med Cell Longev*. 2014, 208408.

Tanzi RE. The Genetics of Alzheimer Disease. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012, 2(10):a006296.

Tebar F, Bohlander SK, Sorkin A. Clathrin assembly lymphoid myeloid leukemia (CALM) protein: localization in endocytic-coated pits, interactions with clathrin, and the impact of overexpression on clathrin-mediated traffic. *Mol Biol Cell*. 1999, 10(8):2687-702.

Thambisetty M, Simmons A, Velayudhan L, Hye A, Campbell J, Zhang Y, Wahlund LO, Westman E, Kinsey A, Güntert A, Proitsi P, Powell J, Causevic M, Killick R, Lunnon K,

Lynham S, Broadstock M, Choudhry F, Howlett DR, Williams RJ, Sharp SI, Mitchelmore C, Tunnard C, Leung R, Foy C, O'Brien D, Breen G, Furney SJ, Ward M, Kloszewska I, Mecocci P, Soininen H, Tsolaki M, Vellas B, Hodges A, Murphy DG, Parkins S, Richardson JC, Resnick SM, Ferrucci L, Wong DF, Zhou Y, Muehlboeck S, Evans A, Francis PT, Spenger C, Lovestone S. Association of plasma clusterin concentration with severity, pathology, and progression in Alzheimer disease. *Arch Gen Psychiatry*. 2010, 67(7):739-48.

The Centers for Disease Control and Prevention. Public health and aging: trends in aging--United States and worldwide. *JAMA*. 2003, 289(11):1371-3.

Thomae BA, Eckloff BW, Freimuth RR, Wieben ED, Weinshilboum RM. Human sulfotransferase SULT2A1 pharmacogenetics: genotype-to-phenotype studies. *Pharmacogenomics J*. 2002, 2(1):48-56.

Traish AM, Kang HP, Saad F, Guay AT. Dehydroepiandrosterone (DHEA)--a precursor steroid or an active hormone in human physiology. *J Sex Med*. 2011, 8(11):2960-82.

Tripathy D, Thirumangalakudi L, Grammas P. RANTES upregulation in the Alzheimer's disease brain: a possible neuroprotective role. *Neurobiol Aging*. 2010, 31(1):8-16.

Ubogu EE, Callahan MK, Tucky BH, Ransohoff RM. Determinants of CCL5-driven mononuclear cell migration across the blood-brain barrier. Implications for therapeutically modulating neuroinflammation. *J Neuroimmunol*. 2006a, 179(1-2):132-44.

Ubogu EE, Cossoy MB, Ransohoff RM. The expression and function of chemokines involved in CNS inflammation. *Trends Pharmacol Sci*. 2006b, 27(1):48-55.

Ueba T, Nomura S, Inami N, Yokoi T, Inoue T. Elevated RANTES level is associated with metabolic syndrome and correlated with activated platelets associated markers in healthy younger men. *Clin Appl Thromb Hemost*. 2014, 20(8):813-8.

Vacínová G. *Diabetes mellitus 2. typu a Alzheimerova demence: studium společných patogenetických faktorů*. Praha, 2014. Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze. Přírodovědecká fakulta. Katedra antropologie a genetiky člověka.

Vallee M, Mayo W, Le Moal M. Role of pregnenolone, dehydroepiandrosterone and their sulfate esters on learning and memory in cognitive aging. *Brain Res Brain Res Rev*. 2001, 37(1-3):301-12.

- van den Berg MP, Verhoef JC, Romeijn SG, Merkus FW. Uptake of estradiol or progesterone into the CSF following intranasal and intravenous delivery in rats. *Eur J Pharm Biopharm.* 2004, 58(1):131-5.
- Volmar CH, Ait-Ghezala G, Frieling J, Weeks OI, Mullan MJ. CD40/CD40L interaction induces Abeta production and increases gamma-secretase activity independently of tumor necrosis factor receptor associated factor (TRAF) signaling. *Exp Cell Res.* 2009, 315(13):2265-74.
- Wenk GL. Neuropathologic changes in Alzheimer's disease. *J Clin psychiatry.* 2003, 9:7-10.
- Wimo A, Jönsson, Gustavsson A, McDaid D, Ersek K, Georges J, Gulácsi L, Karpati K, Kenigsberg P, Valtonen H. The economic impact of dementia in Europe in 2008 – cost estimates from the Eurocode project. *Int J Geriatr Psych.* 2011, 28(8):825-32.
- Winkler JM, Fox HS. Transcriptome meta-analysis reveals a central role for sex steroids in the degeneration of hippocampal neurons in Alzheimer's disease. *BMC Syst Biol.* 2013, 7:51.
- Wong SC, Macrae VE, McGrogan P, Ahmed SF. The role of pro-inflammatory cytokines in inflammatory bowel disease growth retardation. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2006, 43(2):144-55.
- Wu F, Yao PJ. Clathrin-mediated endocytosis and Alzheimer's disease: an update. *Ageing Res Rev.* 2009, 8(3):147-9.
- Wu H, Ghosh S, Perrard XD, Feng L, Garcia GE, Perrard JL, Sweeney JF, Peterson LE, Chan L, Smith CW, Ballantyne CM. T-cell accumulation and regulated on activation, normal T cell expressed and secreted upregulation in adipose tissue in obesity. *Circulation.* 2007, 115(8):1029-38.
- Xiong H, Callaghan D, Jones A, Walker DG, Lue LF, Beach TG, Sue LI, Woulfe J, Xu H, Stanimirovic DB, Zhang W. Cholesterol retention in Alzheimer's brain is responsible for high beta- and gamma-secretase activities and Abeta production. *Neurobiol Dis.* 2008, 29(3):422-37.
- Yao PJ, Zhang P, Mattson MP, Furukawa K. Heterogeneity of endocytic proteins: distribution of clathrin adaptor proteins in neurons and glia. *Neuroscience.* 2003, 121(1):25-37.

Yu S, Liu YP, Liu YH, Jiao SS, Liu L, Wang YJ, Fu WL. Diagnostic utility of VEGF and soluble CD40L levels in serum of Alzheimer's patients. *Clin Chim Acta*. 2016, 453:154-9.

Yu JT, Tan L. Clusterin polymorphisms and Alzheimer's disease. *Eur J Epidemiol*. 2012, (9):757-8.

Zhu X, Perry G, Moreira PI, Aliev G, Cash AD, Hirai K, Smith MA. Mitochondrial abnormalities and oxidative imbalance in Alzheimer disease. *J Alzheimers Dis*. 2006, 9(2):147-53.

Zlokovic BV. Cerebrovascular transport of Alzheimer's amyloid beta and apolipoproteins J and E: possible anti-amyloidogenic role of the blood-brain barrier. *Life Sci*. 1996, 59(18):1483-97.

## **8. Internetové zdroje**

Alzheimer's Disease Internation [online]. [cit. 8.9.2018]

Dostupné z: <http://www.alz.co.uk/research/world-report-2015>

Alzforum Networking for a cure [online]. [cit. 9.9.2018]

Dostupné z: <http://www.alzgene.org/meta.asp?geneID=708>

Alzforum Networking for a cure [online]. [cit. 9.9.2018]

Dostupné z: <http://www.alzgene.org/meta.asp?geneID=323>

Alzforum Networking for a cure [online]. [cit. 9.9.2018]

Dostupné z: <http://www.alzgene.org/meta.asp?geneID=635>

Alzforum Networking for a cure [online]. [cit. 9.9.2018]

Dostupné z: <http://www.alzgene.org/meta.asp?geneID=636>

**Přílohy – tabulky**

**Tab. 7 Asociace mezi polymorfismy rs744373 v genu *BIN1*, rs11136000 v genu *CLU*, rs37818361 v genu *CRI* a rs3851179 v genu *PICALM* s glukózovou intolerancí**

Gene dbSNP	GDM				DM2				PGT			
	pacientky (%)	kontroly (%)	p	OR (95% CI)	pacienti (%)	kontroly (%)	p	OR (95% CI)	pacienti (%)	kontroly (%)	p	OR (95% CI)
<i>BIN1</i> rs744373	n=550	n=710			n=391	n=178			n=116	n=624		
AA	306 (55.64)	374 (52.68)	0.323	1.13 (0.90-1.41)	207 (52.94)	90 (50.56)	0.663	1.10 (0.77-1.57)	66 (56.90)	336 (53.85)	0.614	1.13 (0.76-1.69)
AG	207 (37.64)	286 (40.28)	0.370	0.89 (0.71-1.12)	154 (39.39)	73 (41.01)	0.784	0.93 (0.65-1.34)	43 (37.07)	244 (39.10)	0.757	0.92 (0.61-1.38)
GG	37 (6.73)	50 (7.04)	0.915	0.95 (0.61-1.48)	30 (7.67)	15 (8.43)	0.887	0.90 (0.47-1.72)	7 (6.03)	44 (7.05)	0.844	0.85 (0.37-1.93)
A	819 (74.45)	1034 (72.82)	0.380	1.09 (0.91-1.30)	568 (72.63)	253 (71.07)	0.635	1.08 (0.82-1.43)	175 (75.43)	916 (73.40)	0.572	1.11 (0.80-1.54)
G	281 (25.55)	386 (27.18)	0.380	0.92 (0.77-1.10)	214 (27.37)	103 (28.93)	0.635	0.93 (0.70-1.22)	57 (24.57)	332 (26.60)	0.573	0.90 (0.65-1.24)
<i>CLU</i>	n=547	n=706			n=390	n=178			n=117	n=625		
CC	201 (36.75)	253 (35.84)	0.785	1.04 (0.82-1.31)	130 (33.33)	70 (39.33)	0.196	0.77 (0.53-1.11)	46 (39.32)	231 (36.96)	0.704	1.11 (0.74-1.66)
CT	246 (44.97)	333 (47.17)	0.474	0.92 (0.73-1.15)	201 (51.54)	80 (44.94)	0.171	1.30 (0.91-1.86)	50 (42.74)	292 (46.72)	0.489	0.85 (0.57-1.27)
TT	100 (18.28)	120 (16.99)	0.605	1.09 (0.82-1.46)	59 (15.13)	28 (15.73)	0.953	0.95 (0.59-1.56)	21 (17.95)	102 (16.32)	0.765	1.12 (0.67-1.88)
C	648 (59.23)	839 (59.42)	0.957	0.99 (0.84-1.17)	461 (59.10)	220 (61.80)	0.427	0.89 (0.69-1.16)	142 (60.68)	754 (60.32)	0.975	1.02 (0.76-1.35)
T	446 (40.77)	573 (40.58)	0.957	1.01 (0.86-1.18)	319 (40.90)	136 (38.20)	0.427	1.12 (0.87-1.45)	92 (39.32)	496 (39.68)	0.975	0.98 (0.74-1.31)
<i>CRI</i> rs3818361	n=508	n=709			n=390	n=179			n=117	n=626		
GG	302 (59.45)	432 (60.93)	0.644	0.94 (0.74-1.19)	230 (58.97)	99 (55.31)	0.465	1.16 (0.81-1.66)	73 (62.39)	372 (59.42)	0.618	1.13 (0.75-1.70)
AG	177 (34.84)	246 (34.70)	0.993	1.01 (0.79-1.28)	144 (36.92)	72 (40.22)	0.509	0.87 (0.61-1.25)	39 (33.33)	220 (35.14)	0.786	0.92 (0.61-1.40)
AA	29 (5.71)	31 (4.37)	0.354	1.32 (0.79-2.23)	16 (4.10)	8 (4.47)	0.982	0.91 (0.38-2.18)	5 (4.27)	34 (5.43)	0.772	0.78 (0.30-2.03)
G	781 (76.87)	1110 (78.28)	0.439	0.92 (0.76-1.12)	604 (77.44)	270 (75.42)	0.501	1.12 (0.83-1.50)	185 (79.06)	964 (77.00)	0.544	1.13 (0.80-1.59)
A	235 (23.13)	308 (21.72)	0.439	1.08 (0.89-1.32)	176 (22.56)	88 (24.58)	0.501	0.89 (0.67-1.20)	49 (20.94)	288 (23.00)	0.544	0.89 (0.63-1.25)
<i>PICALM</i>	n=548	n=715			n=387	n=179			n=117	n=629		
CC	266 (48.54)	307 (42.94)	0.054	1.25 (1.00-1.57)	151 (39.02)	77 (43.02)	0.418	0.85 (0.59-1.21)	40 (34.19)	283 (44.99)	<b>0.039</b>	<b>0.64 (0.42-0.96)</b>
CT	323 (42.34)	322 (45.03)	0.368	0.90 (0.72-1.12)	175 (45.22)	84 (46.93)	0.773	0.93 (0.65-1.33)	54 (46.15)	272 (43.24)	0.630	1.13 (0.76-1.67)
TT	50 (9.12)	86 (12.03)	0.119	0.73 (0.51-1.06)	61 (15.76)	18 (10.06)	0.091	1.67 (0.96-2.93)	23 (19.66)	74 (11.76)	<b>0.029</b>	<b>1.84 (1.09-3.08)</b>
C	764 (69.71)	936 (65.45)	<b>0.027</b>	<b>1.21 (1.03-1.44)</b>	477 (61.63)	238 (66.48)	0.132	0.81 (0.62-1.05)	134 (57.26)	838 (66.61)	<b>0.007</b>	<b>0.67 (0.51-0.89)</b>
T	332 (30.29)	494 (34.55)	<b>0.027</b>	<b>0.82 (0.70-0.97)</b>	297 (38.37)	120 (33.52)	0.132	1.23 (0.95-1.61)	100 (42.74)	420 (33.39)	<b>0.007</b>	<b>1.49 (1.12-1.98)</b>

OR - odds ratio s 95% konfidenčním intervalem; dbSNP - single nucleotide polymorphism database; BIN1 - bridging integrator-; CLU - clusterin; CRI - complement receptor 1; PICALM - phosphatidylinositol binding clathrin assembly protein; GDM - gestační diabetes mellitus; DM2 - diabetes mellitus 2. typu; PGT – porušená glukózová tolerance); p – hladina významnosti; statistická analýza chí-kvadrát test

Tab. 9 Frekvence genotypů nalezených variant u vybraných exonů kandidátních genů pro AD

Gen	Genotyp	Frekvence (n)		Frekvence (%)		p hodnota
		AD (n=97)	ADK (n=76)	AD (n=97)	ADK (n=76)	
<i>APOE</i>	rs429358					
	TT	62	58	64,6	76,3	0,13
	CT	27	18	28,1	23,7	0,63
	CC	7	0	7,3	0	0,09
	rs7412					
	CC	92	64	95,8	84,2	<b>0,02</b>
	CT	4	12	4,2	15,8	<b>0,02</b>
	TT	0	0	0	0	0,58
	rs769452					
	TT	95	75	97,9	98,7	0,83
	CT	2	1	2,1	1,3	0,83
	CC	0	0	0	0	0,59
<i>BINI</i>	rs1060743					
	TT	46	43	47,4	55,2	0,38
	CT	44	30	45,4	39,5	0,53
	CC	7	4	7,2	5,3	0,83
<i>CLU</i>	rs7982					
	CC	40	32	41,2	42,7	0,97
	CT	46	28	47,4	37,3	0,24
	TT	11	15	11,4	20,0	0,17
	rs9331916					
	GG	58	46	59,8	63,9	0,70
	AG	34	23	35,1	31,9	0,80
	AA	5	2	5,1	4,2	0,95
	rs28541694					
	GG	58	47	59,8	65,3	0,57
	CG	31	22	32,0	30,5	0,98
	CC	8	3	8,2	4,2	0,45
	rs3216167					
	TT	47	35	48,5	44,8	0,74
	T-	42	31	43,3	40,8	0,86
	--	8	11	8,2	14,4	0,29
<i>CRI</i>	—					

Statistický program NCSS 2004; p, hladina významnosti chí-kvadrát test; AD, pacienti s AD; ADK, kontrolní senioři

Tab. 10 Hodnoty naměřených adipokinů a inkretinů u pacientů s AD a kontrolních seniorů

	AD				ADK				p hodnota	
	muži (n=19)		ženy (n=15)		muži (n=30)		ženy (n=28)			
	medián [pg/ml]	95% LCL	95% UCL	medián [pg/ml]	95% LCL	95% UCL	medián [pg/ml]	95% LCL		95% UCL
leptin	1440	1014	2636	4967	3638	7658	2565	1388	4389	0.16
resistin	4495	3501	5011	3189	2900	3837	3192	2608	4174	<b>0.04</b>
visfatin	860	654	1244	502	299	723	562	307	1023	<b>0.01</b>
adipsin	752588	652929	1177700	660437	552903	731420	885505	614759	937190	0.58
adiponektin	8628800	3935000	10886000	13301000	9881100	16635000	8410800	6479700	15429000	0.56
GIP	217	160	316	249	193	306	224	153	247	0.62
GLP-1	200	179	216	166	141	177	149	128	203	<b>0.01</b>
leptin	4514	2898	6644	4967	3638	7658	4967	3638	7658	0.33
resistin	4302	3608	4784	3189	2900	3837	3189	2900	3837	0.06
visfatin	1015	802	1320	502	299	723	502	299	723	<b>&lt;0,01</b>
adipsin	895668	589100	1136700	660437	552903	731420	660437	552903	731420	0.06
adiponektin	16028500	10920000	20847000	13301000	9881100	16635000	13301000	9881100	16635000	0.25
GIP	281	230	410	249	193	306	249	193	306	0.14
GLP-1	200	181	252	166	141	177	166	141	177	<b>&lt;0,01</b>

Statistický program NCSS 2004; p, hladina významnosti; Kruskal-Wallis One-Way ANOVA test; AD, pacienti s AD; ADK, kontrolní seniori; LCL, lower control limit; UCL, upper control limit

Tab. 11 Hodnoty měřitelných cytokinů u pacientů s AD a kontrolních seniorů

	AD muži (n=39)			ADK muži (n=26)			p hodnota
	medián [pg/ml]	95% LCL	95% UCL	medián [pg/ml]	95% LCL	95% UCL	
sCD40L	54,2	34,25	67,75	38,03	24,14	52,43	<b>0,04</b>
TNF- $\alpha$	5,59	4,54	8,79	30,59	6,67	38,34	<b>&lt;0,01</b>
IL-6	16,93	11,2	26,15	36,29	9,58	45,6	0,50
	ženy (n=48)			ženy (n=50)			
	medián [pg/ml]	95% LCL	95% UCL	medián [pg/ml]	95% LCL	95% UCL	
sCD40L	58,34	47,9	76,35	35,29	24,09	47,46	<b>&lt;0,01</b>
TNF- $\alpha$	9,14	6,65	11,24	23,79	7,63	33,51	0,07
IL-6	18,35	15,92	23,72	29,99	18,71	36,89	0,51

Statistický program NCSS 2004; p, hladina významnosti Kruskal-Wallis One-Way ANOVA test; LCL, lower control limit; UCL, upper control limit; AD, pacienti s AD; ADK, kontrolní seniři



Tab 12. Hodnoty naměřených parametrů spojených s neurodegenerací

	AD muži (n=39)			ADK muži (n=23)			p hodnota
	medián [pg/ml]	95% LCL	95% UCL	medián [pg/ml]	95% LCL	95% UCL	
BDNF	6178	4498	10556		*		
MPO	128841	101625	165174	96997	81382	141821	0.16
NCAM	819727	675083	957504	779440	652021	867088	0.47
PDGF-AA	1225	937	1993		*		
PDGF-AA/BB	11558	7753	14983		*		
RANTES	67357	46604	98628	1680	855	3132	<0,01
sICAM-1	342584	311947	370540	346268	290079	375084	0.83
sVCAM-1	2275900	1890200	2521700	2073750	1928600	2282900	0.24
Enolase 2	21,3	16,4	24,1	7,2	6,2	8,9	<0,01
Cystatin C	634	523	711	565	515	628	0.18
	AD ženy (n=46)			ADK ženy (n=53)			
	medián [pg/ml]	95% LCL	95% UCL	medián [pg/ml]	95% LCL	95% UCL	p hodnota
BDNF	7716	6023	11368		*		
MPO	154654	101625	192083	89996	69886	106971	<0,01
NCAM	700712	608939	793716	667753	566803	717340	0.22
PDGF-AA	1833	1310	2321		*		
PDGF-AA/BB	14461	9961	23942		*		
RANTES	79230	64598	119893	655	477	833	<0,01
sICAM-1	299802	275766	367368	343184	311793	367069	0.18
sVCAM-1	2243700	2057700	2403500	2026150	1733400	2321200	0.1
Enolase 2	26,6	21,2	39,3	8,2	6,6	9,1	<0,01
Cystatin C	838	559	712	564	509	617	0.07

Statistický program NCSS 2004; p, hladina významnosti; Kruskal-Wallis One-Way ANOVA test; LCL, lower control limit; UCL, upper control limit; AD, pacienti s AD; ADK, kontrolní senioři; \*, ADK pod mezí detekce

Tab. 13 Hladiny steroidních hormonů u pacientů s AD a kontrolních seniorů (uvedeny jsou pouze analyty, které se mezi sledovanými soubory významně lišily)

	<b>AD</b>	<b>ADK</b>	<b>p hodnota</b>
	<b>muži (n=18)</b>	<b>muži (n=11)</b>	
	průměr [nmol/l] ± SD	průměr [nmol/l] ± SD	
Pregnanolon	0.07 ± 0.034	0.04 ± 0.0304	0.01
5β-Pregnan-3α,20α-diol C	22.9 ± 13.21	10.8 ± 4.17	0.006
16α-hydroxy-dehydroepiandrosteron	0.06 ± 0.0444	0.03 ± 0.0226	0.03
5α-Androstan-3β,17β-diol C	81.1 ± 56.82	137.4 ± 61.54	0.02
	<b>AD</b>	<b>ADK</b>	<b>p hodnota</b>
	<b>ženy (n=30)</b>	<b>ženy (n=22)</b>	
	průměr [nmol/l] ± SD	průměr [nmol/l] ± SD	
Pregnenolon	1.6 ± 1.38	0.9 ± 0.48	0.03
16α-hydroxy-pregnenolon	0.2 ± 0.15	0.1 ± 0.11	0.02
16α-hydroxy-progesterone	0.7 ± 0.54	0.5 ± 0.72	0.02
5β-Pregnan-3α,20α-diol C	13.5 ± 7.15	8.6 ± 3.71	0.005
Androsteron C	220.2 ± 201.1	403.5 ± 227.87	0.001
Epiandrosteron C	77.6 ± 55.23	152.2 ± 85.52	0.001
Epietiocholanolon C	8.9 ± 7.26	16.5 ± 11.55	0.003
5α-Androstan-3β,17β-diol C	15.9 ± 11.61	48.4 ± 44.71	0.0001
5β-Androstan-3α,17β-diol C	3.3 ± 1.88	4.6 ± 2.35	0.05

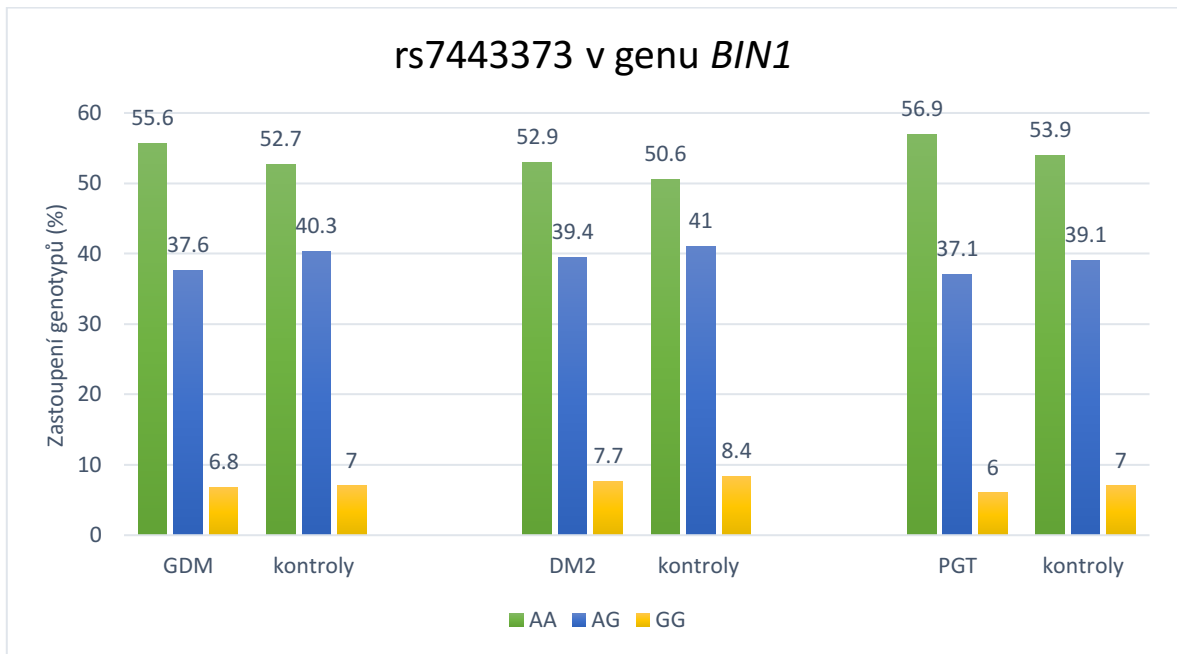
Statistický program NCSS 2004; Two-Sample test; SD, směrodatná odchylka; AD, pacienti s AD; ADK, kontrolní senioři; p, hladina významnosti; C, konjugovaná forma

Tab. 14 Poměry mezi konjugovanými steroidy a jejich nekonjugovanými protějšky u pacientů s AD a kontrolních seniorů

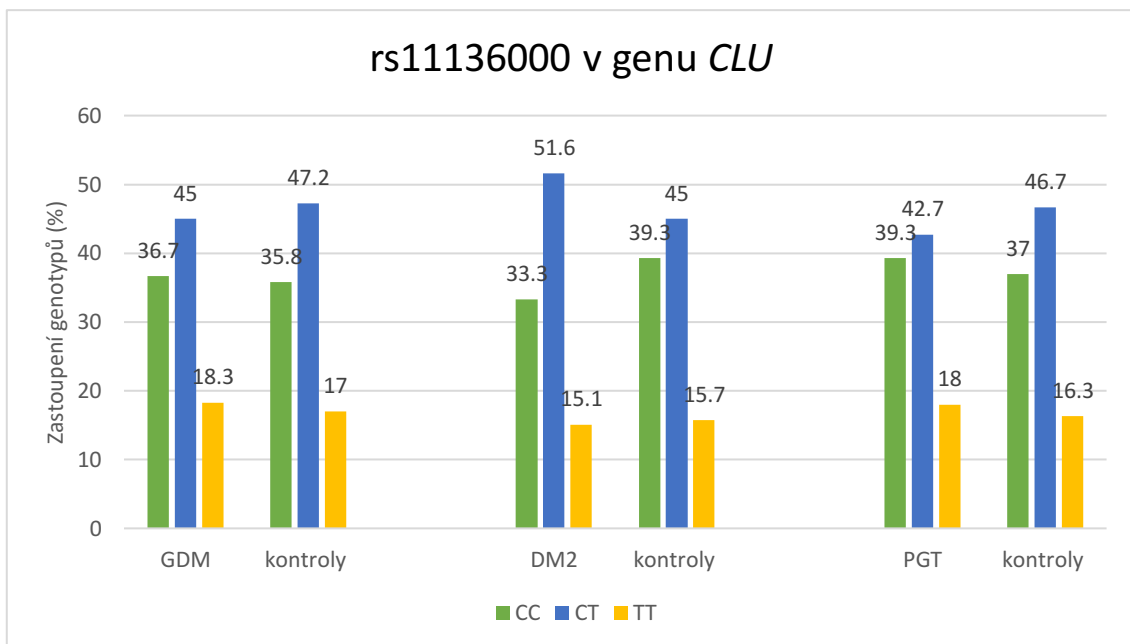
Konjugované/nekonjugované steroidy	AD		ADK	p hodnoty (ANCOVA)			
	průměr (95% konfidenční interval)	AD		pohlaví	věk	BMI	
C21 steroidy	pregnenolon sulfát/ pregnenolon	muži	73(60;89)	0,451	0,003	0,574	0,054
		ženy	51(43;59)				
	allopregnanolon sulfát/ allopregnanolon	muži	27(22;33)	0,285	0,089	0,830	0,764
		ženy	24(21;28)				
	isopregnanolon sulfát/ isopregnanolon	muži	69(58;82)	0,219	0,001	0,364	0,418
		ženy	42(36;49)				
	DHEAS/ DHEA	muži	205(165;253)	0,046	<0,001	0,735	0,361
		ženy	121(102;143)				
	androstenediol sulfát/ androstenediol	muži	507(363;734)	0,109	0,347	0,409	0,122
		ženy	455(358;589)				
androsteron sulfát/ androsteron	muži	398(1031;834)	0,037	0,227	0,005	0,501	
	ženy	1894(1561;2268)					
epiandrosteron sulfát/ epiandrosteron	muži	528(419;654)	0,016	<0,001	0,103	0,982	
	ženy	374(312;443)					
5 $\alpha$ -androstan-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol sulfát/ 5 $\alpha$ -androstan-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol	muži	567(400;801)	0,006	0,011	0,329	0,573	
	ženy	301(231;391)					
5 $\alpha$ -androstan-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol sulfát/ 5 $\alpha$ -androstan-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol	muži	1611(1210;2085)	0,048	0,114	0,067	0,071	
	ženy	1100(874;1357)					

Statistický program Statgraphics Centurion XV; ANCOVA s adjustací na věk a BMI s faktory statusu AD a pohlaví; p, hladina významnosti; AD, pacienti s AD; ADK, kontrolní seniori

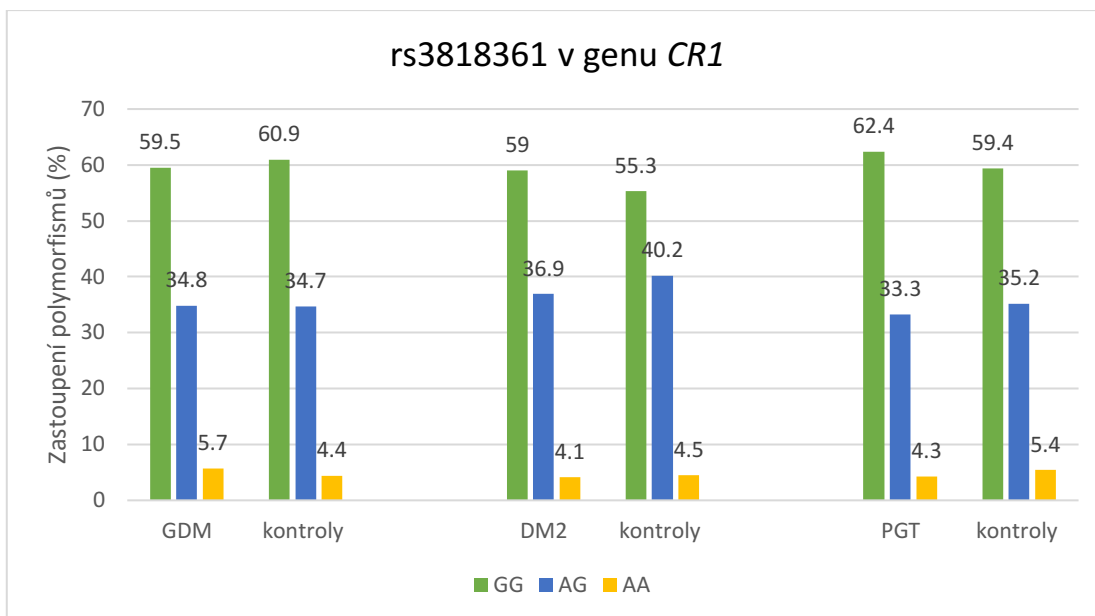
## Přílohy – obrázky



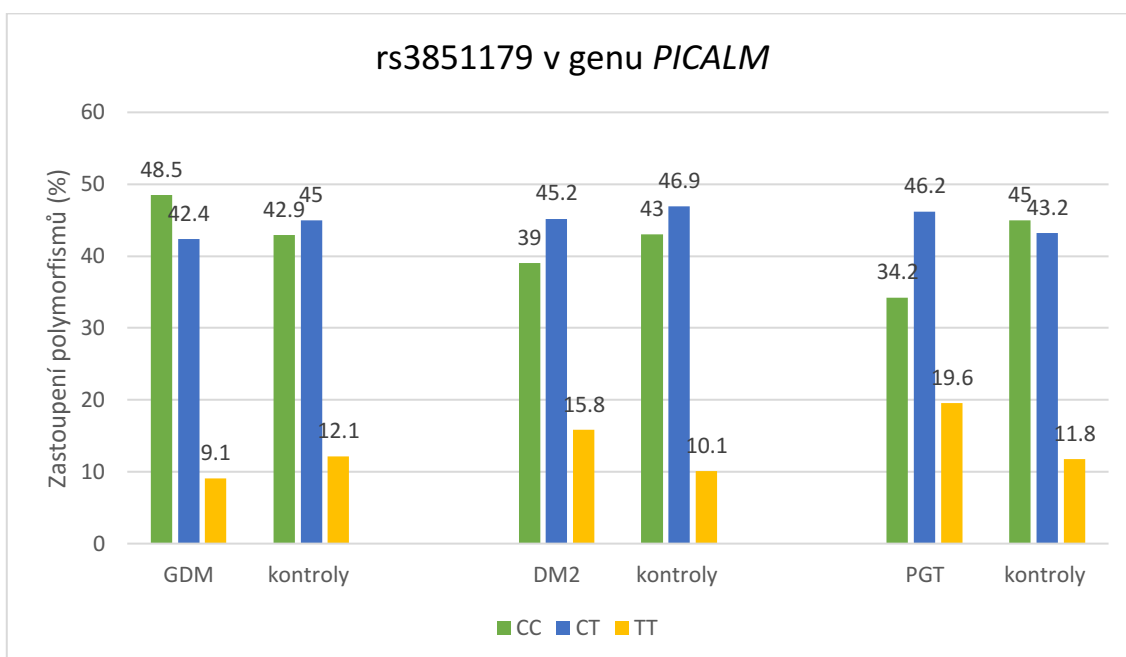
Obr. 5 Zastoupení polymorfismu rs7443373 v genu *BIN1* u pacientek s GDM, pacientů s DM2, jedinců s PGT a jednotlivých kontrolních souborů



Obr. 6 Zastoupení polymorfismu rs11136000 v genu *CLU* u pacientek s GDM, pacientů s DM2, jedinců s PGT a jednotlivých kontrolních souborů



Obr. 7 Zastoupení polymorfismu rs3818361 v genu *CR1* u pacientek s GDM, pacientů s DM2, jedinců s PGT a jednotlivých kontrolních souborů



Obr. 8 Zastoupení polymorfismu rs3851179 v genu *PICALM* u pacientek s GDM, pacientů s DM2, jedinců s PGT a jednotlivých kontrolních souborů

## Přílohy – publikace

1. Vacínová G, Vejražková D, Lukášová P, Lischková O, Dvořáková K, Rusina R, Holmerová I, Vaňková H, Včelák J, Bendlová B, Vaňková M. Associations of polymorphisms in the candidate genes for Alzheimer's disease BIN1, CLU, CR1 and PICALM with gestational diabetes and impaired glucose tolerance. *Mol Biol Rep.* 2017, 44(2):227-231.

IF=1,889

*V této studii jsem se podílela na sběru materiálu a jeho primárním zpracování. U všech vzorků jsem provedla genetickou analýzu, data statisticky vyhodnotila a sepsala publikaci.*

2. Vaňková M, Hill M, Velíková M, Včelák J, Vacínová G, Dvořáková K, Lukášová P, Vejražková D, Rusina R, Holmerová I, Jarolímová E, Vaňková H, Kancheva R, Bendlová B, Stárka L. Preliminary evidence of altered steroidogenesis in women with Alzheimer's disease: Have the patients "OLDER" adrenal zona reticularis? *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2016, 158:157-177.

IF=3,628

*V této studii jsem se podílela na preanalytické fázi – účastnila jsem se sběru materiálu (od pacientek s AD i kontrolních seniorek) a vzorky jsem primárně zpracovávala.*

3. Vaňková M, Hill M, Velíková M, Včelák J, Vacínová G, Lukášová P, Vejražková D, Dvořáková K, Rusina R, Holmerová I, Jarolímová E, Vaňková H, Bendlová B. Reduced sulfotransferase SULT2A1 activity in patients with Alzheimer's disease. *Physiol Res.* 2015, 64 Suppl 2:S265-73.

IF=1,643

*V této studii jsem se podílela na preanalytické fázi – účastnila jsem se sběru materiálu u pacientů s AD i kontrolních seniorů. Vzorky jsem následně primárně zpracovávala.*



## Associations of polymorphisms in the candidate genes for Alzheimer's disease *BINI*, *CLU*, *CRI* and *PICALM* with gestational diabetes and impaired glucose tolerance

Gabriela Vacínová<sup>1,2</sup> · D. Vejražková<sup>1</sup> · P. Lukášová<sup>1</sup> · O. Lischková<sup>1</sup> · K. Dvořáková<sup>1</sup> · R. Rusina<sup>3,4</sup> · I. Holmerová<sup>5</sup> · H. Vaňková<sup>5,6</sup> · J. Včelák<sup>1</sup> · B. Bendlová<sup>1</sup> · M. Vaňková<sup>1</sup>

Received: 1 February 2016 / Accepted: 11 March 2017  
© Springer Science+Business Media Dordrecht 2017

**Abstract** Alzheimer's disease (AD) is the most common type of dementia, with a prevalence that is rising every year. AD is associated with type 2 diabetes mellitus (T2DM) and insulin resistance, and is therefore sometimes called "type 3 diabetes mellitus". The aim of this study was to examine whether the variants of some candidate genes involved in the development of AD, namely *BINI* (rs744373), *CLU* (rs11136000), *CRI* (rs3818361), and *PICALM* (rs3851179), are related to several disorders of glucose metabolism—gestational diabetes (GDM), T2DM and impaired glucose tolerance (IGT). Our study included 550 women with former GDM and 717 control women, 392 patients with T2DM and 180 non-diabetic controls, and 117 patients with IGT and 630 controls with normal glucose tolerance. Genotyping analysis was performed using specially-designed TaqMan assays. No significant associations of the genetic variants rs744373 in *BINI*, rs11136000 in *CLU*, or rs3818361 in *CRI* were found with

GDM, T2DM or IGT, but rs3851179 in *PICALM* was associated with an increased risk of GDM. The frequency of the AD risk-associated C allele was significantly higher in the GDM group compared to controls: OR 1.21; 95% CI (1.03–1.44). This finding was not apparent in T2DM and IGT; conversely, the C allele of the *PICALM* SNP was protective for IGT: OR 0.67; 95% CI (0.51–0.89). This study demonstrates an association between *PICALM* rs3851179 and GDM as well as IGT. However, elucidation of the possible role of this gene in the pathogenesis of GDM requires further independent studies.

**Keywords** Alzheimer's disease · Glucose metabolism · Gestational diabetes mellitus · Type 2 diabetes mellitus · Impaired glucose tolerance · Polymorphisms

### Introduction

Alzheimer's disease (AD) is a progressive neurodegenerative disorder, with a prevalence that is rising every year. There are about 44 million people with AD worldwide and it is estimated that this number will double by 2030 [1].

AD is characterized by the deposition of  $\beta$ -amyloid in the brain, which leads to the formation of "senile plaques".  $\beta$ -amyloid is toxic to neurons, and excessive accumulation in the extracellular space leads to neuronal apoptosis [2]. AD is also characterized by the excessive deposition of intracellular hyperphosphorylated  $\tau$ -protein.  $\tau$ -protein clusters into "neurofibrillary tangles", with excessive phosphorylation leading to the structural damage of neurons [3].

AD has also sometimes been described as "brain diabetes", or "type 3 diabetes mellitus" [4]. The role of insulin and insulin-like growth factor I (IGF-I) in the pathogenesis of AD and their connection with glucose metabolism

✉ Gabriela Vacínová  
gvacinova@endo.cz

<sup>1</sup> Department of Molecular Endocrinology, Institute of Endocrinology, Národní 8, Prague 116 94, Czech Republic

<sup>2</sup> Department of Anthropology and Human Genetics, Faculty of Science, Charles University in Prague, Prague, Czech Republic

<sup>3</sup> Thomayer Hospital, Prague, Czech Republic

<sup>4</sup> Department of Neurology and Center of Clinical Neuroscience, First Faculty of Medicine and General University Hospital in Prague, Charles University in Prague, Prague, Czech Republic

<sup>5</sup> Faculty of Humanities, Charles University in Prague, Prague, Czech Republic

<sup>6</sup> Third Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Prague, Czech Republic

is clear. In the brains of patients with AD, lower levels of insulin, IGF-I and other elements like insulin receptor substrate have been found, while levels of amyloid-precursor protein (APP) are elevated [5]. Furthermore, lower expressions of insulin and IGF-I receptors, as well as damage to the signal transmission of these mediators, have been described [6, 7]. Subsequent brain insulin resistance is one of many factors that can influence the development of AD.

The gene that is most commonly associated with AD is apolipoprotein E (*APOE*) and its risk-associated allele  $\epsilon 4$ . In recent years, genome-wide association studies (GWAS) have revealed 9 candidate genes (*BINI*, *CRI*, *CLU*, *PICALM*, *MS4A4/MS4A6E*, *CD2AP*, *CD33*, *EPHA1*, and *ABCA7*) that are associated with AD or can influence the development of AD [8–11]. Due to these connections between AD and type 2 diabetes mellitus (T2DM), we wanted to know if candidate genes for AD may play a role in another type of diabetes—gestational diabetes mellitus (GDM)—or in people with impaired glucose tolerance (IGT).

For this study, four genes associated with AD were selected: *BINI*, *CLU*, *CRI*, and *PICALM*. In order to detect relationships between these genes and the disorders of glucose metabolism analysed here, we genotyped the following polymorphisms in all our participants: rs744373 in *BINI*, rs11136000 in *CLU*, rs381361 in *CRI*, and rs3851179 in *PICALM*.

## Materials and methods

### Study participants

The study consisted of 2172 participants, divided into three groups with associated controls. We examined 550 women with former GDM and 717 healthy control women, 392 patients with T2DM and 180 healthy controls, and 117 subjects with IGT and 630 healthy controls (Table 1). Patients with former GDM were women without AD, T2DM or IGT. Controls for the GDM group were women

without GDM, AD, T2DM or IGT. Subjects in both groups were older than 20 years. Patients with T2DM were subjects without AD, IGT or GDM. Healthy controls for the T2DM patients were without T2DM, AD, IGT, or GDM, and were older than 40 years. Participants with IGT were subjects with impaired glucose tolerance (fasting glycemia of 5,6–7 mmol/l or glycemia at 120 min of the oral glucose tolerance test of 7,8–11 mmol/l) without AD, T2DM, or GDM, and were over 20 years of age. Healthy controls were subjects over 25 years without IGT, AD, T2DM or GDM. All members of this study were unrelated. No participants mentioned a family history of AD in a questionnaire. Each subject signed a written informed consent for participation in this study.

### Genotyping analysis

DNA was extracted from peripheral blood and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until analysis. Samples were genotyped by Endpoint Genotyping with TaqMan assays (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) using Real-Time PCR.

### Statistical analysis

Statistical analysis was done using the program NCSS 2004. For the evaluation of statistical differences between cases and controls, the Chi square test was used. Each studied polymorphism was evaluated in controls using the Hardy–Weinberg equilibrium (HWE) in an online HWE calculator. Odds ratios (OR) and 95% confidence intervals (95% CI) were used to assess associations between selected genes and the risk of GDM, T2DM and IGT.

## Results

The genotypic and allelic frequencies of rs744373 in *BINI*, rs11136000 in *CLU*, rs381361 in *CRI*, and rs3851179 in *PICALM* are given in Table 2. There was no statistically significant difference between the groups in the genotypic

**Table 1** Characteristics of GDM and T2DM patients, IGT subjects and controls

	GDM		T2DM		IGT	
	Cases	Controls	Cases	Controls (n)	Cases	Controls (n)
Number	550	717	392	180	117	630
Men (%)	0	0	40	28	33	22
Age (years)	34.6 (34–35)	28.8 (28–29.56)	62 (60.3–62)	51.4 (49.2–53.3)	49.3 (44.9–54.3)	33.1 (32.3–34.3)
BMI (kg/m <sup>2</sup> ) women	23.2 (22.6–23.7)	23.7 (23.3–24.2)	28.7 (27.7–29.9)	26.3 (25.3–27.5)	28.1 (26.5–29.9)	24.9 (24.4–25.6)
BMI (kg/m <sup>2</sup> ) men			31.1 (30.3–31.9)	25.8 (24.7–26.7)	29.4 (26.9–31.5)	24.7 (24–25.4)

Median, 95% LCL–95% UCL

GDM gestational diabetes mellitus, T2DM type 2 diabetes mellitus, IGT impaired glucose tolerance



**Table 2** Association between *BIN1* rs744373, *CLU* rs1136000, *CR1* rs3818361 and *PICALM* rs3851179 polymorphisms and glucose intolerance

Gene dbSNP	GDM				T2DM				IGT			
	Cases (%)	Controls (%)	p value	OR (95% CI)	Cases (%)	Controls (%)	p value	OR (95% CI)	Cases (%)	Controls (%)	p value	OR (95% CI)
<i>BIN1</i> rs744373	n = 550	n = 710			n = 391	n = 178			n = 116	n = 624		
AA	306 (55.64)	374 (52.68)	0.323	1.13 (0.90–1.41)	207 (52.94)	90 (50.56)	0.663	1.10 (0.77–1.57)	66 (56.90)	336 (53.85)	0.614	1.13 (0.76–1.69)
AG	207 (37.64)	286 (40.28)	0.370	0.89 (0.71–1.12)	154 (39.39)	73 (41.01)	0.784	0.93 (0.65–1.34)	43 (37.07)	244 (39.10)	0.757	0.92 (0.61–1.38)
GG	37 (6.73)	50 (7.04)	0.915	0.95 (0.61–1.48)	30 (7.67)	15 (8.43)	0.887	0.90 (0.47–1.72)	7 (6.03)	44 (7.05)	0.844	0.85 (0.37–1.93)
A	819 (74.45)	1034 (72.82)	0.380	1.09 (0.91–1.30)	568 (72.63)	253 (71.07)	0.635	1.08 (0.82–1.43)	175 (75.43)	916 (73.40)	0.572	1.11 (0.80–1.54)
G	281 (25.55)	386 (27.18)	0.380	0.92 (0.77–1.10)	214 (27.37)	103 (28.93)	0.635	0.93 (0.70–1.22)	57 (24.57)	332 (26.60)	0.573	0.90 (0.65–1.24)
<i>CLU</i> rs1136000	n = 547	n = 706			n = 390	n = 178			n = 117	n = 625		
CC	201 (36.75)	253 (35.84)	0.785	1.04 (0.82–1.31)	130 (33.33)	70 (39.33)	0.196	0.77 (0.53–1.11)	46 (39.32)	231 (36.96)	0.704	1.11 (0.74–1.66)
CT	246 (44.97)	333 (47.17)	0.474	0.92 (0.73–1.15)	201 (51.54)	80 (44.94)	0.171	1.30 (0.91–1.86)	50 (42.74)	292 (46.72)	0.489	0.85 (0.57–1.27)
TT	100 (18.28)	120 (16.99)	0.605	1.09 (0.82–1.46)	59 (15.13)	28 (15.73)	0.953	0.95 (0.59–1.56)	21 (17.95)	102 (16.32)	0.765	1.12 (0.67–1.88)
C	648 (59.23)	839 (59.42)	0.957	0.99 (0.84–1.17)	461 (59.10)	220 (61.80)	0.427	0.89 (0.69–1.16)	142 (60.68)	754 (60.32)	0.975	1.02 (0.76–1.35)
T	446 (40.77)	573 (40.58)	0.957	1.01 (0.86–1.18)	319 (40.90)	136 (38.20)	0.427	1.12 (0.87–1.45)	92 (39.32)	496 (39.68)	0.975	0.98 (0.74–1.31)
<i>CR1</i> rs3818361	n = 508	n = 709			n = 390	n = 179			n = 117	n = 626		
GG	302 (59.45)	432 (60.93)	0.644	0.94 (0.74–1.19)	230 (58.97)	99 (55.31)	0.465	1.16 (0.81–1.66)	73 (62.39)	372 (59.42)	0.618	1.13 (0.75–1.70)
AG	177 (24.84)	246 (34.70)	0.993	1.01 (0.79–1.28)	144 (36.92)	72 (40.22)	0.509	0.87 (0.61–1.25)	39 (33.33)	220 (35.14)	0.786	0.92 (0.61–1.40)
AA	29 (5.71)	31 (4.37)	0.354	1.32 (0.79–2.23)	16 (4.10)	8 (4.47)	0.982	0.91 (0.38–2.18)	5 (4.27)	34 (5.43)	0.772	0.78 (0.30–2.03)
G	781 (76.87)	1110 (78.28)	0.439	0.92 (0.76–1.12)	604 (77.44)	270 (75.42)	0.501	1.12 (0.83–1.50)	185 (79.06)	964 (77.00)	0.544	1.13 (0.80–1.59)
A	235 (23.13)	308 (21.72)	0.439	1.08 (0.89–1.32)	176 (22.56)	88 (24.58)	0.501	0.89 (0.67–1.20)	49 (20.94)	288 (23.00)	0.544	0.89 (0.63–1.25)
<i>PICALM</i> rs3851179	n = 548	n = 715			n = 387	n = 179			n = 117	n = 629		
CC	266 (48.54)	307 (42.94)	0.054	1.25 (1.00–1.57)	151 (39.02)	77 (43.02)	0.418	0.85 (0.59–1.21)	40 (34.19)	283 (44.99)	<b>0.039</b>	<b>0.64 (0.42–0.96)</b>
CT	323 (42.34)	322 (45.03)	0.368	0.90 (0.72–1.12)	175 (45.22)	84 (46.93)	0.773	0.93 (0.65–1.33)	54 (46.15)	272 (43.24)	0.630	1.13 (0.76–1.67)
TT	50 (9.12)	86 (12.03)	0.119	0.73 (0.51–1.06)	61 (15.76)	18 (10.06)	0.091	1.67 (0.96–2.93)	23 (19.66)	74 (11.76)	<b>0.029</b>	<b>1.84 (1.09–3.08)</b>
C	764 (69.71)	936 (65.45)	<b>0.027</b>	<b>1.21 (1.03–1.44)</b>	477 (61.63)	238 (66.48)	0.132	0.81 (0.62–1.05)	134 (57.26)	838 (66.61)	<b>0.007</b>	<b>0.67 (0.51–0.89)</b>
T	332 (30.29)	494 (34.55)	<b>0.027</b>	<b>0.82 (0.70–0.97)</b>	297 (38.37)	120 (33.52)	0.132	1.23 (0.95–1.61)	100 (42.74)	420 (33.39)	<b>0.007</b>	<b>1.49 (1.12–1.98)</b>

Bold values indicate significance level ( $p < 0.05$ )

OR odds ratio with 95% confidence interval, *dbSNP* single nucleotide polymorphism database, *BIN1* bridging integrator-1, *CLU* clusterin, *CR1* complement receptor 1, *PICALM* phosphatidylinositol binding clathrin assembly protein, *GDM* gestational diabetes mellitus, *T2DM* type 2 diabetes mellitus, *IGT* impaired glucose tolerance

Statistical analysis by Chi square test

and allelic frequencies of the polymorphisms rs744373, rs11136000, and rs3818361. The C allele (AD risk-associated allele) frequency of rs3851179 was significantly higher in the GDM group than in controls, and was associated with an increased risk of GDM ( $p=0.027$ ; OR 1.21; 95% CI 1.03–1.44). On the other hand, the C allele frequency of rs3851179 was significantly lower in the IGT group than in controls ( $p=0.007$ ; OR 0.67; 95% CI 0.51–0.89). This trend was also apparent in the group of patients with T2DM, but was not statistically significant.

## Discussion

AD is a complex multifactorial disease, with genetic as well as environmental factors playing a role in its pathogenesis. AD is sometimes called “type 3 diabetes” because lower levels of insulin and IGF-I and lower expression of the receptors of these hormones have been found in the brains of AD patients compared to healthy controls [5, 6]. The most well-known high-risk gene associated with AD is *APOE*, namely the allele  $\epsilon 4$ , that plays a role in lipid metabolism [12]. Recently, GWAS [9, 11, 13] found a strong association between AD and the genes *BINI*, *CLU*, *CRI*, *PICALM*, among others. However, there is little known about their (patho) physiological functions. To our knowledge, there is no published data regarding possible associations between these AD risk genes and disorders of glucose metabolism or insulin resistance. In this study, we evaluated whether genes involved in the development of AD have any relation to three disorders of glucose metabolism—GDM, T2DM and IGT.

The genotypic and allelic frequencies of *BINI* (rs744373), *CLU* (rs11136000) and *CRI* (rs3818361) did not differ between the groups of patients and their respective control groups. The only significant finding was the association of the *PICALM* (rs3851179) C/T variant with GDM and IGT. Our results show that the distribution of genotypic and allelic frequencies in *PICALM* (rs3851179) found in a relatively large group of GDM patients are similar to the genotypic and allelic frequencies of AD patients published in the literature (AD patients: CC 45%, CT 41%, TT 14%; allelic frequencies: C 66%, T 34%) [13]. The presence of the AD risk-conferring C allele was associated with an increased risk of GDM. Paradoxically, our GDM patients have a significantly lower frequency of the minor AD “protective” allele T compared to controls, and even have a less frequent allele T than patients with AD. The T allele frequency was also significantly higher in the group of our IGT subjects compared to their

controls. A higher T allele frequency was also found in T2DM patients and their controls compared to AD. These results indicate that GDM pathogenesis is different from T2DM and IGT, and that *PICALM* (rs3851179) could play an important role.

There is little known about the role of *PICALM* in AD and T2DM, and even less is known about its possible role in GDM pathophysiology. In fact, there is just scarce information on associations of this gene with any specific diseases. Studies have shown that *PICALM* plays a critical role in iron homeostasis. Cellular iron import is influenced by the transferrin receptor (TfR) and is dependent on clathrin-mediated endocytosis. Overexpression of *PICALM* impairs TfR endocytosis, which impacts the ability of cells to import iron. In addition, *PICALM* plays a key role in cell proliferation [14].

Iron homeostasis is disrupted in AD. Peripheral blood iron metabolism markers are impaired in AD, with serum iron concentrations in particular as well as transferrin and ferritin (an iron stores biomarker) levels significantly decreased in patients with AD compared with controls [15]. On the other hand, in specific brain areas, e.g. the basal ganglia, iron concentrations are increased in AD compared with controls [16].

Iron homeostasis is also disrupted in GDM. In contrast to AD, recent studies have shown that women with GDM have higher concentrations of serum ferritin and higher concentrations of serum iron compared to pregnant controls [17, 18]. These women transport iron more actively than those without GDM. Levels of TfR are also elevated in women with GDM compared with non-GDM pregnant controls [19]. These indicate that increased concentrations of ferritin, iron and TfR are associated with a higher risk of GDM development.

*PICALM* plays a further role in cellular cholesterol metabolism, which is disrupted in AD and T2DM, and in cellular lipid homeostasis. Defects in *PICALM* result in the altered expression of genes in the cholesterol biosynthesis pathway, and its loss contributes to increasing LDL receptor expression at the cell surface, enhanced cholesterol uptake and increased total cellular cholesterol. However, *PICALM* does not play an essential role in LDL receptor internalization, but may be necessary for the proper intracellular trafficking of cholesterol [20]. In connection with T2DM, another polymorphism (rs541458) in *PICALM* was associated with a steeper longitudinal decline in neurocognitive speed [21].

Thus, impaired endocytosis could influence proper lipid metabolism, insulin receptor downregulation and many other important metabolic processes whose dysregulation is or could be associated with GDM.

## Conclusion

In conclusion, this study demonstrates an association between the *PICALM* SNP rs3851179 and two types of disturbed glucose metabolism, GDM and IGT. Elucidation of the possible role of this gene in the pathogenesis of GDM requires further independent studies.

**Acknowledgements** Supported by the Ministry of Health, Czech Republic—conceptual development of a research organization (Institute of Endocrinology—EU, 00023761) and by IGA NT/13543-4 Ministry of Health, Czech Republic.

## Compliance with ethical standards

**Conflict of interest** There is no conflict of interest.

## References

- Prince M, Albanese E, Guerchet M, Prina M (2014) World Alzheimer report 2014. Alzheimer's Disease International, London, England
- Pimplikar SW (2009) Reassessing the amyloid cascade hypothesis of Alzheimer's disease. *Int J Biochem Cell Biol* 41(6):1261–1268
- Ballatore C, Lee VM, Trojanowski JQ (2007) Tau-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease and related disorders. *Nat Rev Neurosci* 8(9):663–672
- Steen E, Terry BM, Rivera EJ, Cannon JL, Neely TR, Tavares R, Xu XJ, Wands JR, de la Monte SM (2005) Impaired insulin and insulin-like growth factor expression and signaling mechanisms in Alzheimer's disease—is type 3 diabetes? *J Alzheimers Dis* 7(1):63–80
- de la Monte SM, Wands JR (2005) Review of insulin and insulin-like growth factor expression, signaling, and malfunction in the central nervous system: relevance to Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 7(1):45–61
- Rivera EJ, Goldin A, Fulmer N, Tavares R, Wands JR, de la Monte SM (2005) Insulin and insulin-like growth factor expression and function deteriorate with progression of Alzheimer's disease: link to brain reductions in acetylcholine. *J Alzheimers Dis* 8(3):247–268
- Steen E, Terry BM, Rivera EJ, Cannon JL, Neely TR, Tavares R, Xu XJ, Wands JR, de la Monte SM (2005) Impaired insulin and insulin-like growth factor expression and signaling mechanisms in Alzheimer's disease—is the type 3 diabetes? *J Alzheimers Dis* 7(1):63–80
- Waring SC, Rosenberg RN (2008) Genome-wide association studies in Alzheimer disease. *Arch Neurol* 65(3):329–334
- Lambert JCh, Heath S, Even G et al (2009) Genome-wide association study identifies variants at *CLU* and *CR1* associated with Alzheimer's disease. *Nat Genet* 41(10):1094–1099
- Seshadri S, Fitzpatrick AL, Ikram MA et al (2010) Genome-wide analysis of genetic loci associated with Alzheimer disease. *JAMA* 303(18):1832–1840
- Kamboh MI, Demirci FY, Wang X et al (2012) Genome-wide association study of Alzheimer's disease. *Transl Psychiatry* 2(5):e117
- Vilatela MEA, López-López M, Yescas-Gómez P (2012) Genetics of Alzheimer's disease. *Arch Res Med* 43(8):622–631
- Harold D, Abraham R, Hollingworth P et al (2009) Genome-wide association study identifies variants at *CLU* and *PICALM* associated with Alzheimer's disease. *Nat Genet* 41(10):1088–1093
- Scotland PB, Heath JL, Conway AE, Porter NB, Armstrong MB, Walker JA, Klebig ML, Lavau CP, Wechsler DS (2012) The *PICALM* protein plays a key role in iron homeostasis and cell proliferation. *PLoS ONE* 7(8):e44252
- Crespo AC, Silva B, Marques L, Marcelino E, Maruta C, Costa S, Timoteo A, Vilares A, Couto FS, Faustino P, Correia AP, Verdelho A, Porto G, Guerreiro M, Herrero A, Costa C, de Mendoca A, Costa L, Martins M (2014) Genetic and biochemical markers in patients with Alzheimer's disease support a concentrated systemic iron homeostasis dysregulation. *Neurobiol Aging* 35(4):777–785
- Bartzokis G, Tishler TA (2000) MRI evaluation of basal ganglia ferritin iron and neurotoxicity in Alzheimer's and Huntington's disease. *Cell Mol Biol* 46(4):821–833
- Amiri FN, Basirat Z, Omidvar S, Sharbatdaran M, Tilaki KH, Pouramir M (2013) Comparison of the serum iron, ferritin levels and total iron-binding capacity between pregnant women with and without gestational diabetes. *J Nat Sci Biol Med* 4(2):302–305
- Khambalia AZ, Aimone A, Nagubandi P, Roberts CL, McElduff A, Morris JM, Powell KL, Tasevski V, Nassar N (2016) High maternal iron status, dietary iron intake and iron supplement use in pregnancy and risk of gestational diabetes mellitus: a prospective study and systematic review. *Diabet Med* 33(9):1211–1221
- Yang A, Zhao J, Lu M, Gu Y, Zhu Y, Chen D, Fu J (2016) Expression of hepcidin and ferroportin in the placenta, and ferritin and transferrin receptor 1 levels in maternal and umbilical cord blood in pregnant women with and without gestational diabetes. *Int J Environ Res Public* 13(8):766
- Mercer JL, Argus JP, Crabtree DM, Keenan MM, Wilks MQ, Chi JT, Bensinger SJ, Lavau CP, Wechsler DS (2015) Modulation of *PICALM* levels perturbs cellular cholesterol homeostasis. *PLoS ONE* 10(6):e0129776
- McFall GP, Wiebe SA, Vergote D, Anstey KJ, Dixon RA (2015) Alzheimer's genetic risk intensifies neurocognitive slowing associated with diabetes in non-demented older adults. *Alzheimers Dement* 1(4):395–402



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jsbmb](http://www.elsevier.com/locate/jsbmb)



## Preliminary evidence of altered steroidogenesis in women with Alzheimer's disease: Have the patients "OLDER" adrenal zona reticularis?



Markéta Vaňková<sup>a,\*</sup>, Martin Hill<sup>a</sup>, Marta Velíková<sup>a</sup>, Josef Včelák<sup>a</sup>, Gabriela Vacínová<sup>a</sup>, Kateřina Dvořáková<sup>a</sup>, Petra Lukášová<sup>a</sup>, Daniela Vejražková<sup>a</sup>, Robert Rusina<sup>b</sup>, Iva Holmerová<sup>c</sup>, Eva Jarolímová<sup>c</sup>, Hana Vaňková<sup>c,d</sup>, Radmila Kancheva<sup>a</sup>, Běla Bendlová<sup>a</sup>, Luboslav Stárka<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Institute of Endocrinology, Národní 8, Prague 116 94, Czech Republic

<sup>b</sup> Department of Neurology, Thomayer's Hospital, Vídeňská 800, Prague 140 59, Czech Republic

<sup>c</sup> Faculty of Humanities, Charles University in Prague, Ovocný trh 5, Prague 110 00, Czech Republic

<sup>d</sup> Third Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Ovocný trh 5, Prague 110 00, Czech Republic

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 9 July 2015

Received in revised form 7 December 2015

Accepted 10 December 2015

Available online 15 December 2015

#### Keywords:

Alzheimer's disease

Steroid metabolome

Women

GC-MS

RIA

Multivariate statistics

### ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) represents more than half of total dementias. Various factors including altered steroid biosynthesis may participate in its pathophysiology. We investigated how the circulating steroids (measured by GC-MS and RIA) may be altered in the presence of AD. Sixteen women with AD and 22 age- and BMI-corresponding controls aged over 65 years were enrolled in the study. The steroid levels (47 steroids and steroid polar conjugates) and their ratios in AD female patients indicated increased CYP11A1 activity, weakened activity of the CYP17A1C17,20 lyase metabolic step and attenuated sulfotransferase SULT2A1 activity at higher activity of the CYP17A1 17-hydroxylase step. The patients showed diminished HSD3B2 activity for C21 steroids, abated conversion of 17-hydroxyprogesterone to cortisol, and significantly elevated cortisol. The women with AD had also attenuated steroid 7 $\alpha$ -hydroxylation forming immunoprotective  $\Delta^3$ -C19 steroids, attenuated aromatase activity forming estradiol that induces autoimmunity and a shift from the 3 $\beta$ -hydroxy-5 $\alpha$ / $\beta$ -reduced C19 steroids to their neuroinhibitory and antiinflammatory GABAergic 3 $\alpha$ -hydroxy- counterparts and showed higher levels of the 3 $\alpha$ -hydroxy-5 $\alpha$ / $\beta$ -reduced C21 steroids and pregnenolone sulfate (improves cognitive abilities but may be both protective and excitotoxic). Our preliminary data indicated functioning of alternative "backdoor" pathway in women with AD showing higher levels of both 5 $\alpha$ / $\beta$ -reduced C21 steroids but reduced levels of both 5 $\alpha$ / $\beta$ -reduced C21 steroids, which implied that the alternative "backdoor" pathway might include both 5 $\alpha$ - and 5 $\beta$ -reduced steroids. Our study suggested relationships between AD status in women based on the age of subjects and levels of 10 steroids measured by GC-MS.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Alzheimer's disease (AD) is responsible for up to 60% of dementia cases in older adults. Dementia remains one of the biggest global public health challenges facing our generation. The number of people living with dementia worldwide today is estimated at 44 million, set to almost double by 2030 and more than triple by 2050 [1]. AD is a neurodegenerative disease with progressive decline of episodic memory and impairment in other cognitive domains leading to dementia with loss of autonomy. Magnetic resonance imaging (MRI) typically shows brain atrophy predominant in the hippocampal, temporal and parietal regions. The disease is characterized by an extracellular aggregation of

\* Corresponding author.

E-mail addresses: [mvankova@endo.cz](mailto:mvankova@endo.cz) (M. Vaňková), [mhill@endo.cz](mailto:mhill@endo.cz) (M. Hill), [mvelikova@endo.cz](mailto:mvelikova@endo.cz) (M. Velíková), [jvcelak@endo.cz](mailto:jvcelak@endo.cz) (J. Včelák), [gvacinova@endo.cz](mailto:gvacinova@endo.cz) (G. Vacínová), [kdvorakova@endo.cz](mailto:kdvorakova@endo.cz) (K. Dvořáková), [plukasova@endo.cz](mailto:plukasova@endo.cz) (P. Lukášová), [dvejrazkova@endo.cz](mailto:dvejrazkova@endo.cz) (D. Vejražková), [robert.rusina@ftn.cz](mailto:robert.rusina@ftn.cz) (R. Rusina), [iva.holmerova@gerontocentrum.cz](mailto:iva.holmerova@gerontocentrum.cz) (I. Holmerová), [eva.jarolimova@gerontocentrum.cz](mailto:eva.jarolimova@gerontocentrum.cz) (E. Jarolímová), [h.van@seznam.cz](mailto:h.van@seznam.cz) (H. Vaňková), [rkanceva@endo.cz](mailto:rkanceva@endo.cz) (R. Kancheva), [bbendlova@endo.cz](mailto:bbendlova@endo.cz) (B. Bendlová), [lstarika@endo.cz](mailto:lstarika@endo.cz) (L. Stárka).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jsbmb.2015.12.011>

0960-0760/© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

$\beta$ -amyloid protein into neuritic plaques, aggregation of hyperphosphorylated  $\tau$ -protein with formation of intraneuronal neurofibrillary tangles and progressive neuronal cell loss affecting in particular acetylcholinergic, monoaminergic, and peptidergic neurons, activation of microglia with inflammatory reactions and destructive actions of free oxygen radicals.

Definite diagnosis of AD requires neuropathological confirmation from autopsy or brain biopsy tissue samples, but biopsy is only rarely performed in patients with neurodegenerative dementia. Current diagnostic criteria for probable AD are based on clinical and neuropsychological assessment, mesial temporal atrophy on MRI, and cerebrospinal fluid (CSF) analyses with increased total  $\tau$ -protein, phosphorylated  $\tau$ -protein, and low  $\beta$ -amyloid protein levels [1]. Due to considerable variability between laboratories analyzing CSF and the absence of reliable and widely accepted MRI volumetric protocols, the role of biomarkers in early AD remains still controversial [1].

There is increasing evidence that pathological processes in the brain of AD patients may begin even 10–20 years before the first disease symptoms appear [2], therefore, the need for early diagnosis is essential and other biomarkers may be helpful. From a variety of factors participating in the pathophysiology of AD the alterations in steroid and particularly neurosteroid biosynthesis have been discussed in the literature in association with the disease [3–8].

Steroid hormones are effective regulators of many physiological processes, including those in the brain. Steroid hormones participate in brain glucoregulation, affect the formation and removal of ROS (reactive oxygen species). Steroids play a role in the protective or reparative processes leading to cell death, promote neurogenesis and myelination and also reduce neuroinflammation. They also directly influence the formation of  $\beta$ -amyloid protein and  $\tau$ -protein phosphorylation. Steroid hormones also affect the immune system and are therefore of potential use in the treatment of AD (see review [9]). Some authors using rat models suggested that  $\beta$ -amyloid induced cognitive insufficiency may follow a reduction of certain neuroactive steroids such as pregnenolone and progesterone and elevation of estradiol in brain tissues. Moreover, the expression of inflammatory mediators stimulated by  $\beta$ -amyloid may be dose dependently reversed by progesterone with simultaneous improvement of cognitive abilities [4].

Various steroidogenic enzymes are expressed in the brain tissue but their activity may substantially differ from the one in periphery [3]. Most probably, the absence of key mRNAs and absence of corresponding enzyme activities rule out the *de novo* synthesis of most corticoids and sex steroids in important brain tissues [3,10]. On the other hand, some steroids such as pregnenolone and 11-deoxycorticosterone may be synthesized *de novo* in human central and peripheral nervous systems and steroids of peripheral origin may be further metabolized in the brain [3–11].

The *de novo* pregnenolone brain synthesis is indicated by strikingly higher pregnenolone levels in brain when compared to the circulating levels [12–16]. Furthermore, non-pregnant subjects [17] and fetuses have comparable pregnenolone levels in brain [18] but fetuses have exceedingly elevated circulating pregnenolone levels when compared to non-pregnant subjects [17].

Due to the lipophilic nature of steroids their concentrations in brain tissues (containing high amounts of lipophilic substances) are commonly several times higher in comparison with their concentrations in circulation and cerebrospinal fluid [14]. Levels of numerous steroids in periphery, however, correlate with those in cerebrospinal fluid and may penetrate across the blood-brain barrier (BBB). Steroid passive transport across the BBB by transmembrane diffusion, non-saturable process inversely related to the steroid polarity. Steroids rapidly penetrate across the BBB

establishing a balance, which directly mirrors the circulating levels [19–24]. Furthermore, peripheral application of estradiol and progesterone (such as intravenous infusion or application through a nasal route) shows comparable plasma and CSF concentration-time profiles with a maximum at 15 min after application and  $AUC_{CSF}/AUC_{plasma}$  ratios  $2.0 \pm 0.6\%$  and  $2.2 \pm 0.8\%$  ( $AUC$  represents area under the curve) for estradiol and progesterone, respectively after intravenous infusion. Similar results were found after intranasal application [25]. Therefore, the contribution of peripheral steroids to the steroid milieu in the CNS is important and alterations in the peripheral steroidogenesis may influence neuronal activity in the brain.

Although the steroid transport between the brain and periphery may be slowed by globulin binding, the steroid-globulin complex decreases the steroid clearance and has little influence on the total steroid amount transported to the brain [19,24]. In spite of the substantially higher circulating levels of steroid sulfates when compared to their unconjugated counterparts, the levels of sulfated steroids in brain tissues are lower when compared with their unconjugated analogues [13,18,26] most probably due to their less polarity and the efflux transport via organic anion transporting polypeptide. The efflux transport is a saturable process that may be inhibited by other steroid sulfates and further endogenous substances [27]. For instance in dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS), the apparent efflux clearance across the BBB was about 10 fold greater than its influx one [28]. Furthermore, the brain tissues of primates exhibit relatively high activity of steroid sulfatase, which readily hydrolyzes the steroid sulfates [29].

The adrenal biosynthesis in human is profoundly different from the biosynthesis of the most commonly used laboratory animals like mice, rats and pigs, which do not synthesize greater amounts of adrenal androgens [30] and do not exhibit higher adrenal expression of *SULT2A1* [31]. Rodents and pigs are able to synthesize the corticosteroids and another  $\Delta^4$  steroids via both  $\Delta^4$  and  $\Delta^5$  metabolic pathways [32], while other mammals as primates and ruminants synthesize the  $\Delta^4$  steroids through  $\Delta^5$  metabolism [32]. In addition, marsupials and some other species including human [33–36] may convert the C21  $5\alpha$ -reduced precursors to the  $5\alpha$ -reduced C19 equivalents. This conversion is subsequently catalyzed by *CYP17A1C17-hydroxylase* and C17, 20-lyase steps. Although in most of Old world primates the fetal zone of the fetal adrenal and adult adrenal *zona reticularis* produce large amounts of C19 steroids, the age, gender and social status differences in these species are different from the C19 steroid levels in human [37]. Even the great apes show some differences in adrenal androgen production. For instance the female chimpanzees show about three time lower levels of DHEAS and less sharp decline with age in comparison with women [38]. Therefore, the use of laboratory animals as models for alterations in human steroidogenesis is mostly inadequate, particularly as concerns *zona reticularis* and including mammalian species as cattle and great apes may not reflect the steroid biosynthesis in human. As the adrenal steroidogenesis and namely the activity of the *zona reticularis*, which produces several neuroactive steroids may be important in the pathophysiology of AD, an evaluation of the steroid metabolome in the circulation of AD patients and age- and gender corresponding controls may be the method of choice. On the other hand, the animal models may be more appropriate for investigation of steroid effects in the pathophysiology of AD, however some authors suggest that even the triple transgenic mice mimicking AD-like pathology may not be the best model for studying the effects of sex steroids in the pathophysiology of AD [39].

This study primarily maps the steroid metabolome in the circulation of female patients with AD and corresponding controls

to detect alterations in AD group, to interpret these alterations regarding the human steroidogenesis and then to build a multivariate model based on relevant steroids measured by GC–MS in a single aliquot evaluating the relationships between the steroids and AD.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Subjects

A total of 16 female AD patients over 65 years fulfilling National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke and the Alzheimer's Disease and Related Disorders Association (NINCDS-ADRDA) criteria for probable Alzheimer's disease and 22 female healthy controls over 65 years participated in the study (Table 1). The majority of AD patients were examined at the time of AD diagnosis (14 patients), 1 AD patient was treated for less than one year and only 1 patient was treated for more than one year (33 months). Among AD patients were 5 women with type 2 diabetes mellitus treated with oral antidiabetic agents, 10 patients with treated hypertension, 2 patients treated for dyslipidemia, and 2 patients with hypothyroidism. Treatment with selective serotonin reuptake inhibitors was an exclusion criterion for this study.

None of the controls included in our study had type 2 diabetes mellitus, any immunological disease or depression. Five controls had dyslipidemia, and 6 were treated for hypertension.

The patients and controls did not use any drug known to interfere with the steroid biosynthesis and catabolism, especially corticoids, selective serotonin reuptake inhibitors, estrogens, hormone replacement therapy, and nonsteroidal anti-inflammatory drugs.

Diagnosis of AD was confirmed by neuropsychological tests, cerebrospinal fluid analysis, and MRI. Neuropsychological examination included three tests (1) the repeatable battery for the assessment of neuropsychological status (RBANS), (2) the montreal cognitive assessment (MoCA), and (3) geriatric depression scale (GDS).

In our cohort 14 patients had AD, one patient had possible dementia with Lewy bodies in comorbidity, and one patient had AD and significant subcortical ischemic white matter lesions consistent with the diagnosis of mixed dementia. Controls were examined with the same tests and had MRI but lumbar puncture was not performed in these subjects.

Participants were examined after signing an informed consent approved by the Ethics Committee of the Institute of Endocrinology. For the evaluation of basic biochemical parameters and steroid metabolom, 10 mL of blood was withdrawn on fasting in the morning. Blood samples were centrifuged and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until analyzed.

### 2.2. Anthropometric measurements

Anthropometric data were obtained on fasting. Waist circumference was measured halfway between the rib cage and the pelvic bone. Hip circumference was measured at the maximal circumference of the hips. The waist to hip ratio (WHR) was calculated from these measurements. Body mass index (BMI) was calculated as the weight in kilograms divided by the square of the height in meters. Body adiposity index (BAI), a surrogate measure of body fat, was calculated as hip circumference divided by height 1.5 minus 18.

### 2.3. Chemicals

Steroids were purchased from Steraloids (Newport, RI, USA), Sylon B from Supelco (Bellefonte, PA, USA), methoxylamine hydrochloride from Sigma (St. Louis, MO, USA) and solvents from Merck (Darmstadt, Germany).

### 2.4. Instruments

The GCMS-QP2010 Plus system from Shimadzu (Kyoto, Japan) consisted of a gas chromatograph equipped with automatic flow control, AOC-20s autosampler and a single quadrupole detector with an adjustable electron voltage of 10–195 V was utilized. A capillary column with a medium polarity RESTEK Rxi (diameter 0.25 mm, length 15 m, film thickness 0.1  $\mu\text{m}$ ) was used for analyses. Electron-impact ionization with electron voltage fixed at 70 V and emission current set to 160  $\mu\text{A}$  was used for the measurements. The temperature of the injection port, ion source and interface was maintained at 220, 300, and 310  $^{\circ}\text{C}$ , respectively. Analyses were carried out in the splitless mode with a constant linear velocity of the carrier gas (He) which was maintained at 60 cm/s. The septum purge flow was set up to 3 mL/min. The samples were injected using the high pressure mode which was applied at 200 kPa and this pressure was maintained for 1 min. The detector voltage was set to 1.4 kV.

### 2.5. Analytical methods

In total, the levels of 30 circulating unconjugated steroids such as pregnenolone, 17-hydroxypregnenolone, 16 $\alpha$ -hydroxypregnenolone, 20 $\alpha$ -dihydropregnenolone, dehydroepiandrosterone (DHEA), 7 $\alpha$ -hydroxy-DHEA, 7 $\beta$ -hydroxy-DHEA, 16 $\alpha$ -hydroxy-DHEA, androstenediol, 5-androstene-3 $\beta$ ,7 $\alpha$ ,17 $\beta$ -triol, 5-androstene-3 $\beta$ ,7 $\beta$ ,17 $\beta$ -triol, progesterone, 17-hydroxyprogesterone, 16 $\alpha$ -hydroxyprogesterone, 20 $\alpha$ -dihydroprogesterone, cortisol, androstenedione, testosterone, 5 $\alpha$ -dihydrotestosterone, estrone, estradiol, allopregnanolone, isopregnanolone, pregnanolone, androsterone, epiandrosterone, etiocholanolone, epietiocholanolone, 5 $\alpha$ -androstane-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol, 5 $\alpha$ -androstane-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol

**Table 1**  
Characterization of women with Alzheimer's disease (AD) and controls.

Variable	Mean (95% confidence interval)		ANOVA	
	AD (n = 16)	Controls (n = 22)	F	p
Age [year]	74.8 (72.1, 77.7)	66.9 (65.1, 68.8)	12.3	0.001
BMI [kg/m <sup>2</sup> ]	27.7 (25.8, 29.8)	24.9 (23.6, 26.4)	2.5	0.123
WHR	0.843 (0.819, 0.868)	0.811 (0.793, 0.83)	1.9	0.172
BAI [%]	31.7 (29.8, 33.7)	32.3 (30.7, 34.1)	0.1	0.758
HbA1c [mmol/mol]	35.2 (33.4, 36.9)	39.3 (37.9, 40.7)	6.4	0.016
Total cholesterol [nmol/l]	5.55 (5.19, 5.97)	5.03 (4.77, 5.31)	2.4	0.134
HDL-cholesterol [nmol/l]	1.75 (1.58, 1.94)	1.53 (1.4, 1.66)	1.9	0.179
LDL-cholesterol [nmol/l]	3.25 (2.9, 3.63)	2.89 (2.6, 3.19)	1.1	0.295
Triacylglycerols [nmol/l]	1.08 (0.945, 1.26)	1.14 (1.01, 1.3)	0.1	0.743

BMI—body mass index; WHR—waist to hip ratio; BAI—body adiposity index; HbA1c—glycated hemoglobin; HDL—high density lipoprotein; LDL—low density lipoprotein.

were measured. In addition, the levels of 17 conjugated steroids in the circulation were also assessed and they were: pregnenolone sulfate, 20 $\alpha$ -dihydropregnenolone sulfate, DHEAS, 16 $\alpha$ -hydroxy-DHEA sulfate, androstenediol sulfate, allopregnanolone sulfate, isopregnanolone sulfate, conjugated pregnanolone, conjugated 5 $\alpha$ -pregnane-3 $\beta$ ,20 $\alpha$ -diol, conjugated 5 $\beta$ -pregnane-3 $\alpha$ ,20 $\alpha$ -diol, androsterone sulfate, epiandrosterone sulfate, etiocholanolone sulfate, epietiocholanolone sulfate, conjugated 5 $\alpha$ -androstane-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol, conjugated 5 $\alpha$ -androstane-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol, conjugated 5 $\beta$ -androstane-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol. The aforementioned steroids were simultaneously measured by GC–MS using our previously published method (for details see [40–42]). The steroid conjugates were measured in a polar layer after diethyl-ether extraction after hydrolysis according to Dehennin and Peres [43].

The sample preparation for GC–MS analysis was as follows: unconjugated steroids were extracted from 1 mL of serum fluid with diethyl-ether (3 mL). The diethyl-ether extract was dried in the block heater at 37 °C. The lipids in the dry residue of the diethyl-ether extract were separated by partitioning between a mixture of methanol and water 4:1 (1 mL) and pentane (1 mL). The pentane phase was discarded and the polar phase was dried in the vacuum centrifuge at 60 °C (2 h). The dry residue from the polar phase was derivatized first with methoxylamine hydrochloride solution in pyridine (2%) on oxo-groups (60 °C, 1 h). The mixture after the first derivatization was dried in the flow of nitrogen and the dry residue was treated with the reagent Sylon B (99% of bis(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide and 1% of trimethylchlorosilane) forming trimethylsilyl derivatives on hydroxy-groups (TMS-MOX derivatives) (90 °C, 1 h). Finally, the mixture after the second derivatization step was dried in the flow of nitrogen, the dry residue was dissolved in 20  $\mu$ L of iso-octane and 1  $\mu$ L of the solution was used for GC–MS analysis. Steroid conjugates remaining in the polar residues after diethyl ether extraction were analyzed as follows: the polar residues were dried in the vacuum centrifuge at 37 °C (5 h) and the dry residues were hydrolyzed as described elsewhere [43]. The hydrolyzed samples were again dried in the vacuum centrifuge at 37 °C (5 h). The dried residues were reconstituted with 1 mL of chromatographic water and then further processed in the same way as the free steroids. In contrast to the sample preparation of free steroids, the dry residue after the second derivatization step was dissolved in 200  $\mu$ L of iso-octane instead of the 20  $\mu$ L of iso-octane. Prior to further processing, the original samples and the polar phases after diethyl-ether extraction, which were used for the quantification of the steroid conjugates, were spiked with 17 $\alpha$ -estradiol (as an internal standard) to attain a concentration of 1 and 10 ng/mL, respectively. The internal standard was recorded at effective masses  $m/z$  = 231, 285 and 416. The addition of internal standard to body fluid before sample preparation (free steroids) and to polar phase after diethyl-ether extraction (conjugated steroids) assured that the losses during the sample processing were not critical for the steroid quantification.

The levels of 17-hydroxypregnenolone were measured by our specific radioimmunoassay [44] and the 17-hydroxyprogesterone and cortisol levels were estimated using a RIA kits from Immunotech (Marseilles, France).

## 2.6. Terminology of steroid polar conjugates

Concerning the terminology of the steroid polar conjugates, which were used in the text, the term steroid sulfate was used in the case of dominance of 3 $\alpha$ / $\beta$ -monosulfate over other forms of steroid conjugates, while the term conjugated steroid was used in case of comparable amounts of conjugate forms (sulfates, disulfates, and glucuronides). The above mentioned terminology was based on the knowledge from the literature and the

corresponding citations were amended to each steroid in the following list: pregnenolone sulfate [45,46], 20 $\alpha$ -dihydropregnenolone sulfate, DHEAS [46–48], 16 $\alpha$ -hydroxy-DHEA sulfate [46,49], androstenediol sulfate [46,47], allopregnanolone sulfate [50], isopregnanolone sulfate [51], conjugated pregnanolone (sulfate + glucuronide [50]), 5 $\alpha$ -pregnane-3 $\beta$ ,20 $\alpha$ -diol sulfate (3 $\beta$ ,20 $\alpha$ -disulfate + 3 $\beta$ -sulfate) [50], conjugated 5 $\beta$ -pregnane-3 $\alpha$ ,20 $\alpha$ -diol (3 $\beta$ ,20 $\alpha$ -disulfate + 3 $\beta$ -sulfate + glucuronide) [50], androsterone sulfate [46,47], epiandrosterone sulfate [46,47], etiocholanolone sulfate [49], epietiocholanolone sulfate, conjugated 5 $\alpha$ -androstane-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol (glucuronide + sulfate) [47], conjugated 5 $\alpha$ -androstane-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol (sulfate + glucuronide [47]), conjugated 5 $\beta$ -androstane-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol.

## 2.7. Product to precursor ratios

To evaluate the balances between the steroids in reversible metabolic steps or activities of steroidogenic enzymes, we used product to precursor ratios (PPRs), which were also previously used in other studies including ours and were constructed on the basis of common steps of the steroid metabolism (the corresponding references were mentioned further in the text).

### 2.7.1. The ratios of steroid conjugates to unconjugated steroids (C/U)

These ratios mostly reflect the activity of dominant steroid sulfotransferase SULT2A1 possessing wide substrate specificity [52]. SULT2A1 is highly expressed in the adrenal *zona reticularis* and liver [31]. In this study we used these ratios and the recent available knowledge on steroid conjugation in the literature, which is as follows: pregnenolone C/U [17–46], 20 $\alpha$ -dihydropregnenolone C/U [17,52], DHEA C/U [17,46–48,52–59], androstenediol C/U [17–47,52], allopregnanolone C/U [17,50,52], isopregnanolone C/U [17–52], androsterone C/U [17–47,52], epiandrosterone C/U [46,47,52], etiocholanolone C/U [17,49,52], epietiocholanolone C/U [52], 5 $\alpha$ -androstane-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol C/U [47,52], 5 $\alpha$ -androstane-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol C/U [47,52].

### 2.7.2. The balance between hydroxy-steroids and their oxo-counterparts in C3, C17 and C20 positions

This balance is regulated by the reductive and oxidative isoforms of 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenases (HSD17Bs) and by the aldoketoreductases of subfamily 1C (AKR1Cs) (the corresponding references can be found further in the text).

**2.7.2.1. Balance between 3 $\alpha$ -hydroxy-5 $\alpha$ / $\beta$ -reduced steroids and their 3-oxo-counterparts.** This balance is regulated by the aldoketoreductases of subfamily 1C (AKR1Cs) of types 4, 2, 3, and 1 (the order is according to their physiological importance) in the 3 $\alpha$ -direction and by type 6HSD17B in the 3-oxo-one [55,60]. The 5 $\alpha$ -androstane-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol/5 $\alpha$ -dihydrotestosterone ratio [55,60] reflects this balance.

**2.7.2.2. Balance between 3 $\alpha$ -hydroxy-5 $\alpha$ / $\beta$ -reduced steroids and their 3 $\beta$ -hydroxy-counterparts.** In this case, the balance is also regulated by AKR1C of types 4, 2, 3, and 1 in the 3 $\alpha$ -direction and by HSD17B6 in the 3 $\beta$ -one [55,60]. For evaluation of this balance, the steroid ratios were used as follows: allopregnanolone/isopregnanolone [55–61], allopregnanolone/isopregnanolone, sulfates [55,60], androsterone/epiandrosterone [55,60], androsterone/epiandrosterone, sulfates [55,60,62], etiocholanolone/epietiocholanolone [55,60], etiocholanolone/epietiocholanolone, conjugates [55,60], 5 $\alpha$ -androstane-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol/5 $\alpha$ -androstane-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol [55,60], 5 $\alpha$ -androstane-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol/5 $\alpha$ -androstane-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol, conjugates [55,60].

**2.7.2.3. Balance between 3 $\beta$ -hydroxy-5 $\alpha/\beta$ -reduced steroids and their 3-oxo- counterparts.** This balance is regulated by type 6 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase (HSD17B6), which is capable to convert the 3-oxo-steroids to their 3 $\beta$ -counterparts (besides the oxidation of 3 $\alpha$ -hydroxy-steroids to the 3-oxo-ones). To evaluate this balance, the 5 $\alpha$ -androstane-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol/5 $\alpha$ -dihydrotestosterone ratio [55,60] was utilized.

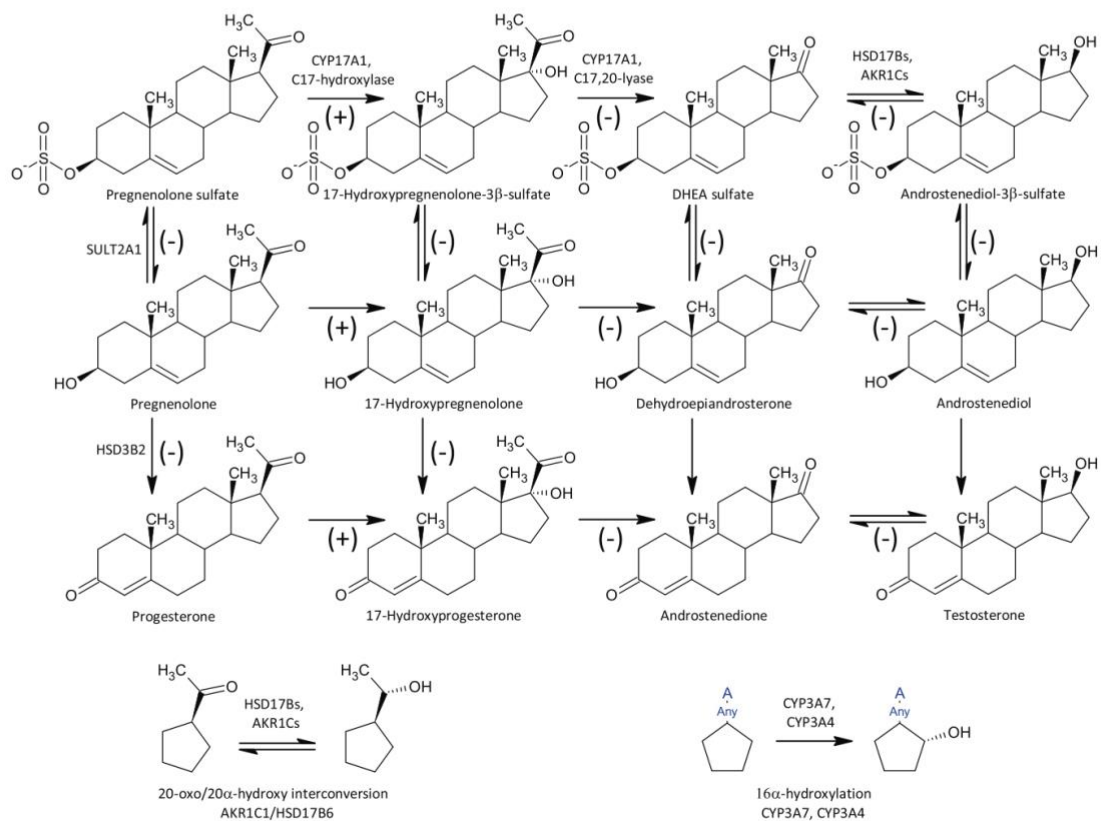
**2.7.2.4. Balance between 17 $\beta$ -hydroxy-C19 steroids and their 17-oxo- counterparts.** The balance between 17 $\beta$ -hydroxy-C19 steroids and their 17-oxo- counterparts may differ from steroid to steroid as concerns the importance of individual HSD17Bs and AKR1Cs isoforms. Therefore, the corresponding enzymes pointed to the individual PPRs in the text. The PPRs reflecting the balance between 17 $\beta$ -hydroxy-C19 steroids and their 17-oxo- counterparts in  $\Delta^5$  C19 steroids were as follows: androstenediol/DHEA, androstenediol sulfate/DHEAS, 5 $\alpha$ -androstane-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol/androstosterone, 5 $\alpha$ -conjugated androstane-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol/androstosterone sulfate, conjugated 5 $\beta$ -androstane-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol/etiocholanolone sulfate, 5 $\alpha$ -androstane-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol/epiandrosterone, conjugated 5 $\alpha$ -androstane-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol/epiandrosterone sulfate [55,60,63], 5-androstene-3 $\beta$ ,7 $\alpha$ ,17 $\beta$ -triol/7 $\alpha$ -hydroxy-DHEA, and 5-androstene-3 $\beta$ ,7 $\beta$ ,17 $\beta$ -triol/7 $\beta$ -hydroxy-DHEA [55–64]. The enzymes regulating the aforementioned balances are HSD17Bs of types 3, 1, 7 and AKR1Cs of types 3 and 1 towards the 17 $\beta$ -hydroxy-C19 steroids and HSD17Bs of types 6 and 2 towards the 17-oxo-C19 steroids.

The balance between testosterone and androstenedione reflected by testosterone/androstenedione ratio is regulated by HSD17Bs of types 3, 1, 7 and AKR1Cs of types 3 and 1 towards the 17 $\beta$ -hydroxy-steroids and by HSD17Bs of types 6, 2 and 4 towards the 17-oxo-steroids [55–66]. The balance between estradiol and estrone reflected by estradiol/estrone ratio is regulated by HSD17Bs of types 1, 3, 7 and AKR1Cs of types 3 and 1 towards the 17 $\beta$ -hydroxy-steroids and by HSD17Bs of types 2 and 6 towards the 17-oxo-steroids.

**2.7.2.5. Balance between 20 $\alpha$ -hydroxy-5 $\alpha/\beta$ -reduced C21 steroids and their 20-oxo- counterparts.** The balance between 20 $\alpha$ -hydroxy-C19 steroids and their 20-oxo- counterparts is regulated by AKR1C1 towards the 20 $\alpha$ -hydroxy C21 steroids and by HSD17B2 towards their 20-oxo-counterparts. The PPRs reflecting this balance were as follows: 20 $\alpha$ -dihydropregnenolone/pregnenolone [55,60], 20 $\alpha$ -dihydropregnenolone/pregnenolone, sulfates [55,60], 20 $\alpha$ -dihydropregesterone/progesterone [55,60], conjugated 5 $\alpha$ -pregnane-3 $\beta$ ,20 $\alpha$ -diol/isopregnanolone sulfate [55,60], and conjugated 5 $\beta$ -pregnane-3 $\alpha$ ,20 $\alpha$ -diol/conjugated pregnanolone [55,60].

**2.7.3. The balance between 7 $\beta$ -hydroxy- $\Delta^5$ -C19 steroids and their 7 $\alpha$ -hydroxy- counterparts**

This balance is regulated by type 1 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase (HSD11B1), which is capable to convert the 7 $\alpha$ -hydroxy- $\Delta^5$ -C19 steroids to their 7 $\beta$ -hydroxy- counterparts (in



**Fig. 1.** Simplified scheme of steroidogenesis in  $\Delta^5$  and  $\Delta^4$  steroidogenic pathways. The intensified and attenuated metabolic steps are labeled by (+) and (–), respectively.



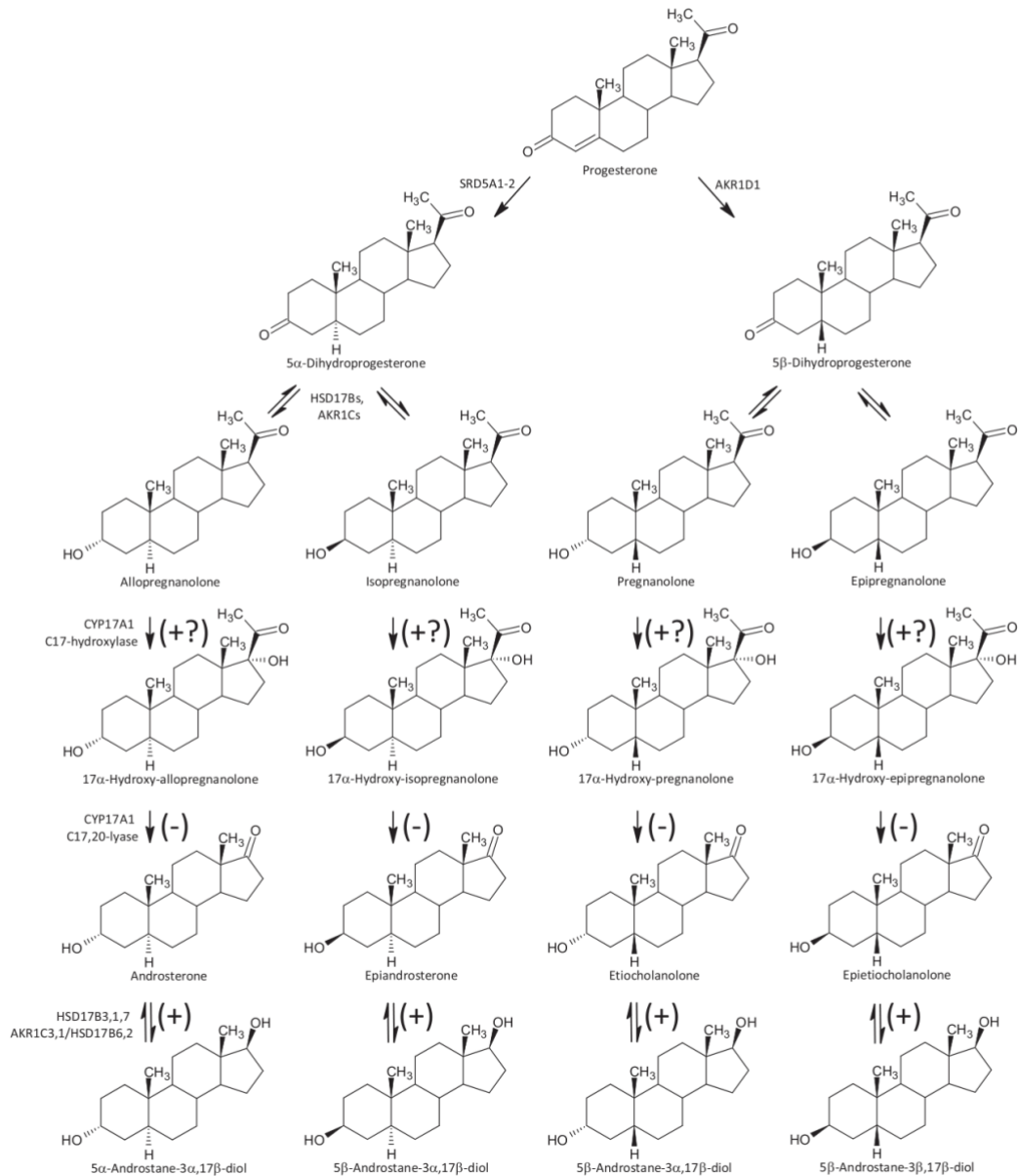
addition to catalyzing the conversion of inactive cortisone to bioactive cortisol) [67]. The PPRs reflecting this balance were as follows: 7 $\beta$ -hydroxy-DHEA/7 $\alpha$ -hydroxy-DHEA [54,64,68], 5-androstene-3 $\beta$ ,7 $\beta$ ,17 $\beta$ -triol/5-androstene-3 $\beta$ ,7 $\alpha$ ,17 $\beta$ -triol [64].

#### 2.7.4. Product to precursor ratios reflecting activities of steroidogenic enzymes

Like above, we used these ratios together with the corresponding citations of publications including these ratios and/or the knowledge on the corresponding metabolic steps.

**2.7.4.1. CYP17A1 (17-hydroxylase).** We evaluated the ratios reflecting activity of C17-hydroxylase-C17,20 lyase in the 17-hydroxylation step as follows: 17-hydroxypregnenolone/pregnenolone [17,69–73], 17-hydroxyprogesterone/progesterone [69,71,74], 16 $\alpha$ -hydroxyprogesterone/progesterone [55,69,71,74] (Fig. 1).

**2.7.4.2. CYP17A1 (C17,20-lyase).** The following ratios reflecting the activity of C17-hydroxylase-C17,20 lyase in the C17,20 lyase were selected: DHEA/17-hydroxypregnenolone [68–73], androstenedione/17-hydroxyprogesterone [69–75] (Fig. 1).



**Fig. 2.** Simplified scheme of progesterone 5 $\alpha$ / $\beta$ -reductive catabolism (including alternative “backdoor” pathway for synthesis of 5 $\alpha$ / $\beta$ -reduced C19 steroids). The intensified and attenuated metabolic steps are labeled by (+) and (-), respectively. The symbol (+?) represents the supposed increase like in the case  $\Delta^5$  steroids.

**2.7.4.3. CYP17A1 (17-hydroxylase + C17,20-lyase).** To evaluate the proportion of the primary precursors pregnenolone and pregnenolone sulfate for CYP17A1 converted to DHEA and DHEAS, respectively, we also evaluated the DHEA/pregnenolone, DHEAS/pregnenolone sulfate (CYP17A1 converts also the 3 $\beta$ -sulfates of C21  $\Delta^5$  steroids [76]), 16 $\alpha$ -hydroxy-DHEA/16 $\alpha$ -hydroxypregnenolone [77], and androstenedione/progesterone ratios (Fig. 1).

**2.7.4.4. Type 2 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase (HSD3B2).** The following ratios reflecting the activity of HSD3B2 were selected: progesterone/pregnenolone [17,69,71], 17-hydroxyprogesterone/17-hydroxypregnenolone [17,69,71,78–81], androstenedione/DHEA [17–69,71], testosterone/androstenediol [17,82] (Fig. 1).

**2.7.4.5. Aromatase (CYP19A1).** The ratios reflecting the CYP19A1 activity were selected as follows: estrone/androstenedione [17,68,73,83–87], estradiol/testosterone [84,85].

**2.7.4.6. Cortisol formation, 21-hydroxylase (CYP21A2) and 11 $\beta$ -hydroxylase (CYP11B1).** The cortisol formation from 17-hydroxyprogesterone (catalyzed by CYP21A2 and CYP11B1 enzymes in sequence) was reflected by cortisol/17-hydroxyprogesterone ratio [56,88–91].

**2.7.4.7. 16 $\alpha$ -Hydroxylase (CYP3A7, CYP3A4).** The 16 $\alpha$ -hydroxylation catalyzed by CYP3A7 and CYP3A4 enzymes was reflected by the following ratios: 16 $\alpha$ -hydroxypregnenolone/pregnenolone [17], 16 $\alpha$ -hydroxy-DHEA/DHEA [17,54,68,92], 16 $\alpha$ -hydroxy-DHEAS/DHEAS [17,54,68,92] (Fig. 1).

**2.7.4.8. 5 $\alpha$ -Reductases (SRD5As).** The activity of SRD5As was reflected by the ratios as follows: (allopregnanolone + isopregnanolone)/progesterone [73], 5 $\alpha$ -dihydrotestosterone/testosterone [66,73],

(androstosterone + epiandrosterone)/androstenedione [73] (Figs. 2 and 3).

**2.7.4.9. Ratio of 5 $\alpha$ -reductase (SRD5As) to 5 $\beta$ -reductase activities (AKR1D1).** The ratio of SRD5As to AKR1D1 activities was reflected by the steroid ratios as follows: allopregnanolone/pregnanolone, conjugates [60,66,73,93–95], androstosterone/etiocholanolone, conjugates [60,66,73,86,93–95] (Figs. 2 and 3).

**2.7.4.10. 5 $\beta$ -Reductase (AKR1D1).** The AKR1D1 activity was reflected by (etiocholanolone + epietiocholanolone)/androstenedione [60,73,93–95] ratio (Figs. 2 and 3).

**2.7.4.11. 7 $\alpha$ -Hydroxylase (CYP7B1).** The activity of CYP7B1 was reflected by the ratios as follows: 7 $\alpha$ -hydroxy-DHEA/DHEA [54–97], 5-androstene-3 $\beta$ ,7 $\alpha$ ,17 $\beta$ -triol/androstenediol [64–97] (Fig. 4).

**2.7.4.12. 7 $\beta$ -Hydroxylase (CYP3A4, CYP3A7).** The 7 $\beta$ -hydroxylation catalyzed by CYP3A4 and CYP3A7 enzymes was reflected by the following ratios: 7 $\beta$ -hydroxy-DHEA/DHEA [54,64,92,98], 5-Androstene-3 $\beta$ ,7 $\beta$ ,17 $\beta$ -triol/androstenediol [64,98] (Fig. 4).

## 2.8. Statistical analysis

To correctly explain the relationships between steroids, PPRs, and presence of AD in women, we used three independent statistical approaches. The first one compared steroid levels and PPRs in AD and age- corresponding controls. In spite of comparable age of both groups, we used age-adjusted ANCOVA to separate the variability in dependent variable shared with age from that one explained by status of the subjects (AD vs. controls). Respecting the skewed distribution and non-constant variance in most dependent variables, these were transformed by power transformations to data symmetry and homoscedasticity prior further processing

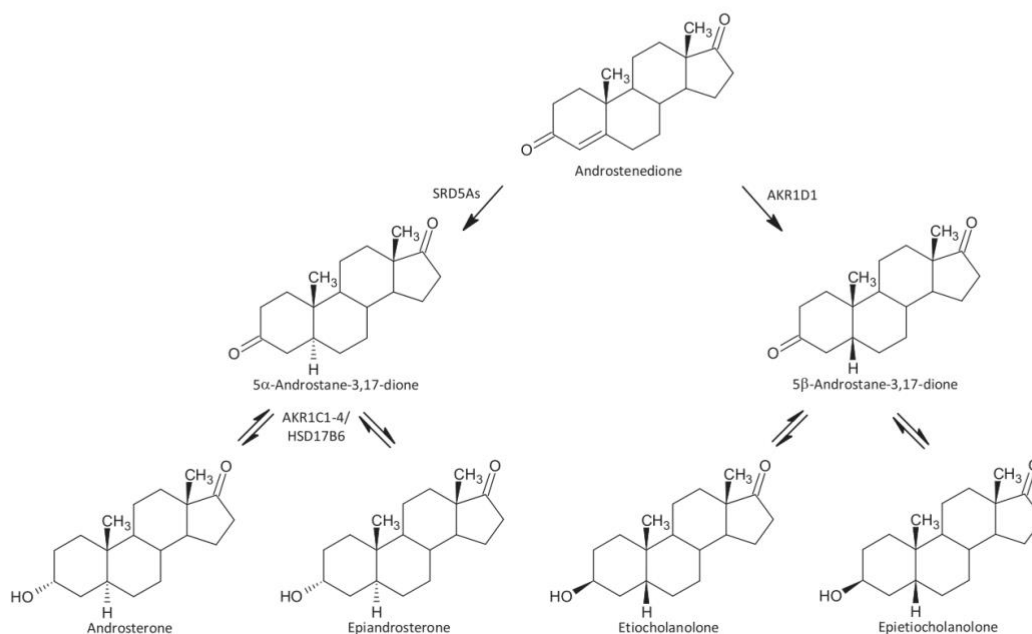


Fig. 3. Simplified scheme of androstenedione 5 $\alpha$ / $\beta$ -reductive catabolism by the classical "frontdoor" pathway for synthesis of 5 $\alpha$ / $\beta$ -reduced C19 steroids.

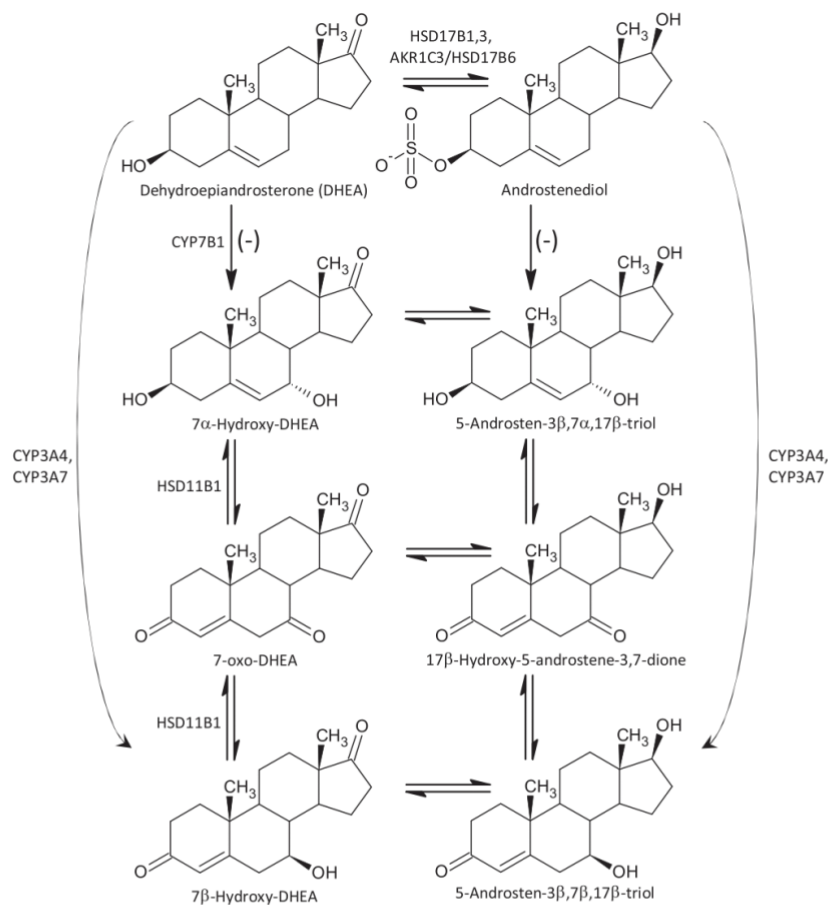


Fig. 4. Simplified scheme for synthesis of immunoprotective 7 $\alpha$ / $\beta$ -hydroxy- metabolites of C19  $\Delta^5$  steroids. The attenuated metabolic step is labeled by (-).

[99]. The homogeneity and distribution of the transformed data was checked by residual analysis as described elsewhere [100,101]. Statistical software Statgraphics Centurion, version XV from Statpoint Inc. (Herndon, Virginia, USA) was used for ANCOVA. The second method used for data evaluation was the analysis using receiver operating characteristics (ROC) as explained elsewhere [102,103]. This method enables the finding of optimum cut-off values from individual dependent variables to differentiate between patients and controls [102,104]. The positivity of pathology may be detected at values higher or below this cut-off value. The optimum cut-off value was found using a maximum of Youden's index for rating diagnostic tests [105]. The effectiveness of individual variables for assessment of AD was estimated using area under curve (AUC) in the plot of sensitivity vs. 1-specificity and the significance of AUC in this plot was evaluated by two-sided test (null hypothesis is that the AUC is equal to 0.5). Statistical software NCSS 2007 from Number Cruncher Statistical Systems (Kaysville, Utah, USA) was used for the ROC analysis.

The third and most efficient method was a simultaneous evaluation of relationships between steroids or PPRs and the

presence of AD by multivariate regression with a reduction of dimensionality known as orthogonal projections to latent structure (OPLS) [103,106–108], which is capable to cope with a problem of severe multicollinearity (high intercorrelations) in the matrix of predictors, whilst the ordinary multiple regression fails to correctly evaluate such data. The multicollinearity in OPLS is favorable as it enhances a predictivity of the model. In our OPLS models, the logarithm of the ratio of probability that the subject is a patient to probability that the subject is a control (logarithm of the likelihood ratio, LLR), was chosen as a single dependent variable, while the age of the subject and steroid levels or PPRs represented the predictors.

The variability in predictors was separated into two independent components. The first one contained the variability predictors, which was shared with probability of the pathology (the predictive component) while the orthogonal components explained the variability shared within the highly intercorrelated predictors.

The OPLS identified the best predictors as well as the best combination of predictors to estimate the probability of the pathology presence. After standardization of the variables, the

OPLS model can be expressed as follows:

$$\mathbf{X} = \mathbf{T}_p \mathbf{P}_p^T + \mathbf{T}_0 \mathbf{P}_0^T + \mathbf{E}$$

$$\mathbf{Y} = \mathbf{T}_p \mathbf{P}_p^T + \mathbf{F}$$

where  $\mathbf{X}$  is the matrix with predictors and subjects,  $\mathbf{Y}$  is the vector of dependent variable and subjects.  $\mathbf{T}_p$  represents the vector of component scores from the single predictive component and subjects extracted from  $\mathbf{Y}$ ,  $\mathbf{T}_0$  is the vector of component scores from the single orthogonal component and subjects extracted from  $\mathbf{X}$ ,  $\mathbf{P}_p$  represents the vector of component loadings for the predictive component extracted from  $\mathbf{Y}$ ,  $\mathbf{P}_0$  represents the vector of component loadings for the orthogonal component extracted from  $\mathbf{X}$  and independent variables, while  $\mathbf{E}$  and  $\mathbf{F}$  are the error terms.

The relevant predictors have been chosen using variable importance (VIP) statistics. The statistical software SIMCA-P v.12.0 from Umetrics AB (Umeå, Sweden), which was used for OPLS analysis, enabled to find the number of relevant components, the detection of multivariate non-homogeneities and testing the multivariate normal distribution and homoscedasticity (constant variance).

The algorithm for obtaining the predictions is as follows:

- Transformation of the original data to obtain the values with symmetric distribution and constant variance.
- Checking the data homogeneity in predictors using Hotelling's statistics and eventual elimination of non-homogeneities.
- Testing the relevance of predictors using the Variable importance statistics and elimination of irrelevant predictors.
- Calculation of component loadings for individual variables to evaluate their correlations with predictive component.
- Calculation of regression coefficients for the multiple regression model to evaluate mutual independence of predictors after comparison with the corresponding component loadings from the OPLS model.
- Calculation of predicted values of logarithm of the ratio of probability of pathology presence to probability of pathology absence (LLR).
- Calculation of probability of the pathology presence for individual subjects.
- Calculation of sensitivity and specificity of the prediction.

### 3. Results

#### 3.1. Steroid levels

##### 3.1.1. ANCOVA

The steroid levels with significant differences between female patients with AD and age- corresponding controls are shown in Table 2. These data indicate a trend to increased levels of some C21 steroids and androstenedione in AD patients reaching significance for pregnenolone sulfate, 17-hydroxypregnenolone, 17-hydroxyprogesterone, 20 $\alpha$ -dihydroprogesterone, allopregnanolone, allo-pregnanolone sulfate, isopregnanolone, pregnanolone, conjugated pregnenolone and conjugated 5 $\beta$ -pregnane-3 $\alpha$ ,20 $\alpha$ -diol. On the other side, the levels of conjugated 5 $\alpha$ -androstane-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol in AD group were two times lower in AD patients.

##### 3.1.2. ROC analysis

As shown in Table 3, some C21 steroids such as pregnenolone, pregnenolone sulfate, 17-hydroxypregnenolone, 16 $\alpha$ -hydroxypregnenolone, cortisol, allopregnanolone, isopregnanolone, pregnanolone, conjugated pregnanolone, and conjugated 5 $\beta$ -pregnane-3 $\alpha$ ,20 $\alpha$ -diol exhibited significant AUCs in the ROC analysis with higher levels of these substances in AD patients. Alternatively, some conjugated 5 $\alpha$ / $\beta$ -reduced C19 steroids such as androsterone sulfate, epiandrosterone sulfate, epitiocolanolone sulfate, conjugated 5 $\alpha$ -androstane-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol were lower in AD patients.

##### 3.1.3. OPLS and multiple regression model for evaluation of relationships between status (patients vs. controls) and steroids measured by GC-MS and RIA

For the correct explanation of the alterations in the adrenal steroid synthesis taking into account the AD pathophysiology we firstly build the model including the steroids measured by both GC-MS and RIA. Table 4 shows the results from the corresponding OPLS and multiple regression (MR) models. The OPLS model explained 62.4% of the total variability in predicted variable. The predicted variable was in the form of logarithm of the ratio of probability of AD presence to probability of AD absence (logarithm of likelihood ratio, LLR of AD presence). Age and some steroids were relevant for building of the OPLS model (as irrelevant predictors were removed from this model as well as from the subsequent multivariate regression). From these predictors the

**Table 2**

Differences between women with Alzheimer's disease (AD) and gender- and age-corresponding controls in the levels of relevant circulating steroids measured by GC-MS or RIA (only the steroid levels with significant differences between patients and controls are shown).

Steroid	Mean (95% confidence interval) (nmol/L)		ANCOVA <sup>b</sup> Factor AD	
	AD	Controls	F	p
Pregnenolone sulfate (↑)	64.6 (51.9, 81.2)	40.7 (34.3, 48.3)	5	0.031
17-Hydroxypregnenolone <sup>a</sup> (↑)	3.24 (1.79, 6.1)	0.537 (0.336, 0.849)	10.7	0.002
17-Hydroxyprogesterone <sup>a</sup> (↑)	1.85 (1.46, 2.38)	1.13 (0.946, 1.35)	5	0.032
20 $\alpha$ -Dihydroprogesterone (↑)	0.287 (0.232, 0.358)	0.184 (0.155, 0.218)	4.8	0.036
Androstenedione (↑)	2.18 (1.74, 2.77)	1.19 (1.01, 1.41)	8.3	0.007
Allopregnanolone (↑)	0.119 (0.103, 0.135)	0.0876 (0.0758, 0.1)	4.4	0.043
Allopregnanolone sulfate (↑)	2.8 (2.32, 3.44)	1.88 (1.64, 2.17)	5.2	0.029
Isopregnanolone (↑)	0.0963 (0.0845, 0.109)	0.066 (0.0579, 0.0744)	8.2	0.007
Pregnanolone (↑)	0.0883 (0.0681, 0.111)	0.0511 (0.0386, 0.0654)	4.2	0.049
Conjugated pregnanolone (↑)	12.3 (9.87, 15.4)	7.98 (6.62, 9.6)	4.1	0.051
Conjugated 5 $\beta$ -pregnane-3 $\alpha$ ,20 $\alpha$ -diol (↑)	13.3 (11.2, 16.1)	7.96 (6.95, 9.14)	9.6	0.004
Conjugated 5 $\alpha$ -androstane-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol (↓)	16.1 (12.3, 21.1)	33.4 (26.5, 42.2)	7.5	0.01

<sup>a</sup> Measured by RIA; ↑ and ↓ represent increased and decreased values in AD patients, respectively.

<sup>b</sup> Age-adjusted ANCOVA.

**Table 3**

Discrimination between women with Alzheimer's disease and age- and gender-corresponding controls on the basis of circulating steroids measured by GC–MS or RIA as evaluated by receiver operating characteristics (ROC).

Steroid	Cut-off value(patients) <sup>c</sup>	Sensitivity	Specificity	Youden's index	AUC <sup>b</sup>	p-Value (2-sided)
Pregnenolone	>0.89	81.3	68.2	0.494	0.736	0.011
Pregnenolone sulfate	>58.2	68.8	77.3	0.46	0.705	0.031
17-Hydroxypregnenolone <sup>a</sup>	>2.7	75.0	86.4	0.614	0.795	<0.001
16 $\alpha$ -Hydroxypregnenolone	>0.14	81.3	68.2	0.494	0.724	0.012
17-Hydroxyprogesterone <sup>a</sup>	>1.22	87.5	72.7	0.602	0.781	<0.001
16 $\alpha$ -Hydroxyprogesterone	>0.33	87.5	54.5	0.420	0.73	0.006
Cortisol <sup>l</sup>	>587	68.8	68.2	0.369	0.702	0.023
Allopregnanolone	>0.13	56.3	95.5	0.517	0.699	0.039
Isopregnanolone	>0.07	75.0	63.6	0.386	0.705	0.024
Pregnanolone	>0.12	50.0	100	0.500	0.719	0.019
Conjugated pregnanolone	>6.53	93.8	45.5	0.392	0.719	0.012
Conjugated 5 $\beta$ -pregnane-3 $\alpha$ ,20 $\alpha$ -diol	>8.49	100	54.5	0.545	0.810	<0.001
Androsterone sulfate	<462	93.8	40.9	0.347	0.682	0.045
Epiandrosterone sulfate	<53.1	37.5	100	0.375	0.722	0.009
Epitiocholanolone sulfate	<12.3	81.3	54.5	0.358	0.699	0.025
Conjugated 5 $\alpha$ -androstane-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol	<22.5	68.8	81.8	0.506	0.787	<0.001

<sup>a</sup> Measured by RIA.

<sup>b</sup> Area under curve, null hypothesis is that AUC = 0.5 . . . no discrimination, AUC = 1 . . . absolute discrimination, respectively.

<sup>c</sup> Criterion for finding optimum cut-off value (at maximum of Youden's index), for details see Section 2.8.

**Table 4**

Discrimination between women with Alzheimer's disease (AD) and age- and gender-corresponding controls on the basis of age of subjects and relevant circulating steroids measured by GC–MS or RIA and analysis of the relationships between AD and the predictors using OPLS model and multiple regression.

	Variable	OPLS, predictive component		Multiple regression		
		Component loading	t-Statistic	R <sup>b</sup>	Regression coefficient	t-Statistic
Relevant predictors	Age (↑)	0.310	4.30	0.632 <sup>**</sup>	0.153	1.83
	Pregnenolone (↑)	0.276	3.67	0.563 <sup>**</sup>	0.029	0.58
	Pregnenolone sulfate	0.187	1.58	0.381	0.057	1.65
	17-Hydroxypregnenolone <sup>a</sup> (↑)	0.303	3.71	0.618 <sup>**</sup>	0.118	1.55
	16 $\alpha$ -Hydroxypregnenolone (↑)	0.236	2.95	0.481 <sup>*</sup>	0.035	0.63
	17-Hydroxyprogesterone <sup>a</sup> (↑)	0.249	3.76	0.508 <sup>**</sup>	0.063	2.25 <sup>*</sup>
	16 $\alpha$ -Hydroxyprogesterone (↑)	0.242	3.00	0.493 <sup>**</sup>	0.028	0.61
	20 $\alpha$ -Dihydroprogesterone	0.132	1.27	0.268	0.096	1.73
	Cortisol <sup>a</sup> (↑)	0.256	3.23	0.521 <sup>**</sup>	0.050	0.95
	Conjugated pregnanolone	0.182	1.62	0.372	0.102	1.51
	Conjugated 5 $\beta$ -pregnane-3 $\alpha$ ,20 $\alpha$ -diol (↑)	0.273	2.98	0.556 <sup>*</sup>	0.152	4.16 <sup>**</sup>
	Epiandrosterone sulfate (↓)	-0.281	-1.96	-0.572 <sup>*</sup>	-0.178	-2.63 <sup>*</sup>
	Epitiocholanolone sulfate (↓)	-0.298	-2.13	-0.608 <sup>*</sup>	-0.127	-4.14 <sup>**</sup>
	Conjugated 5 $\alpha$ -androstane-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol (↓)	-0.371	-3.71	-0.756 <sup>**</sup>	-0.168	-6.96 <sup>**</sup>
	Conjugated 5 $\beta$ -androstane-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol (↓)	-0.220	-2.48	-0.448 <sup>*</sup>	-0.087	-2.35 <sup>*</sup>
	Predicted variable	AD, LLR <sup>c</sup>	1.000	9.17	0.790 <sup>**</sup>	
Explained variability		62.4% (47.9% after cross-validation)				
Discrimination between women with AD and controls (estimates with 95% confidence limits)		Sensitivity = 0.875 (0.640, 0.965)				
		Specificity = 0.955 (0.782, 0.992)				

<sup>\*</sup>  $p < 0.05$ .

<sup>\*\*</sup>  $p < 0.01$ .

<sup>a</sup> Measured by RIA, ↑ and ↓ represent increased and decreased values in AD patients, respectively.

<sup>b</sup> R . . . Component loadings expressed as a correlation coefficients with predictive component.

<sup>c</sup> Logarithm of the ratio of probability of AD presence to probability of AD absence.

C21 steroids such as pregnenolone, 17-hydroxypregnenolone, 16 $\alpha$ -hydroxypregnenolone, 17-hydroxyprogesterone, 16 $\alpha$ -hydroxyprogesterone, cortisol, and conjugated 5 $\beta$ -pregnane-3 $\alpha$ ,20 $\alpha$ -diol positively correlated with the presence of AD, while four conjugated 5 $\alpha$ / $\beta$ -reduced C19 steroids which were epiandrosterone sulfate, epitiocholanolone sulfate, conjugated 5 $\alpha$ -androstane-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol, and conjugated 5 $\beta$ -androstane-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol showed the negative correlations. The OPLS model showed high

sensitivity (0.875 (0.640, 0.965)) and specificity (0.955 (0.782, 0.992)) (shown as estimates with 95% confidence limits).

The corresponding multiple regression model indicated that age and some C21-steroids were not independent predictors due to strong mutual intercorrelations as age, pregnenolone, 17-hydroxypregnenolone, 16 $\alpha$ -hydroxypregnenolone, 16 $\alpha$ -hydroxyprogesterone lost significance in this model. On the other hand, 17-hydroxyprogesterone, conjugated 5 $\beta$ -pregnane-3 $\alpha$ ,20 $\alpha$ -diol and

all of the above mentioned conjugated 5 $\alpha$ / $\beta$ -reduced C19 steroids significantly correlated with AD presence even in the MR model. Therefore, the latter mentioned steroids were significantly (either positively or negatively) associated with AD presence independently of other predictors.

### 3.1.4. OPLS and multiple regression model for evaluation of relationships between status (patients vs. controls) and steroids measured by GC–MS

To suggest a simple model evaluating the relationships between steroids and AD, in the next step we included only the steroids measured by GC–MS in a single sample aliquot. Table 5 shows the results from the corresponding OPLS and MR models. The OPLS model explained 60.6% of the total variability in predicted variable, which was LLR of AD presence. Like in the previous OPLS model (including the steroids measured by both GC–MS and RIA), the GC–MS model gave a similar result. Age and several steroids were relevant for building the OPLS model and from these predictors the C21 steroids such as pregnenolone, pregnenolone sulfate, 16 $\alpha$ -hydroxypregnenolone, 16 $\alpha$ -hydroxyprogesterone, conjugated pregnanolone and conjugated 5 $\beta$ -pregnane-3 $\alpha$ ,20 $\alpha$ -diol positively correlated with the presence of AD. The conjugated 5 $\alpha$ / $\beta$ -reduced C19 steroids such as conjugated 5 $\alpha$ -androstane-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol, and conjugated 5 $\beta$ -androstane-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol showed the negative correlations. The sensitivity of the OPLS model was 0.875 (0.640, 0.965) and specificity was 0.909 (0.713, 0.975) (see Fig. 5).

The corresponding MR model indicated that age and most of the C21-steroids were not independent predictors due to strong mutual intercorrelations as age, pregnenolone, pregnenolone sulfate, 16 $\alpha$ -hydroxypregnenolone, 16 $\alpha$ -hydroxyprogesterone and conjugated pregnanolone lost significance in this model. On the other hand, conjugated 5 $\beta$ -pregnane-3 $\alpha$ ,20 $\alpha$ -diol, and two aforementioned conjugated 5 $\alpha$ / $\beta$ -reduced C19 steroids significantly correlated with AD presence even in the MR model. In

addition, further 5 $\alpha$ / $\beta$ -reduced androstane epiandrosterone sulfate reached significance in the MR model. Therefore, the aforementioned steroids were significantly (either positively or negatively) associated with AD presence independently of other predictors.

### 3.2. Product to precursor ratios (PPRs) reflecting enzyme activities

#### 3.2.1. ANCOVA

Table 6 shows statistically significant differences between women with AD and age- corresponding controls in some PPRs reflecting balances between steroids and/or activities of steroidogenic enzymes.

These data show lower androstenediol C/U ratio possibly due to lower sulfotransferase SULT2A1 activity. Also the DHEA/17-hydroxypregnenolone ratio reflecting the activity of C17,20-lyase step of CYP17A1 and to a less extent the DHEAS/pregnenolone sulfate ratio reflecting the overall activity of both C17-hydroxylase and C17,20-lyase steps of CYP17A1 were lower in the patients' group. On the other hand, the 17-hydroxypregnenolone/pregnenolone ratio, reflecting the activity of the C17-hydroxylase step was higher in the AD group. However, the patients had lower values of progesterone/pregnenolone ratio and 17-hydroxyprogesterone/17-hydroxypregnenolone ratios both reflecting the HSD3B2 activity, and pronouncedly lower values of cortisol/17-hydroxyprogesterone ratio reflecting the 17-hydroxyprogesterone conversion to cortisol (catalyzed by CYP21A2 and CYP11B1 in sequence).

The patients also showed lower estrone/androstenedione ratio reflecting the CYP19A1 activity in the key metabolic pathway of estrogen synthesis. In addition, the patients had lower values of two ratios reflecting a shift from the 17-oxo-5 $\alpha$ / $\beta$ -reduced C19 steroids to their 17 $\beta$ -hydroxy-counterparts such as the conjugated 5 $\beta$ -androstane-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol/conjugated etiocholanolone ratio and conjugated 5 $\alpha$ -androstane-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol/conjugated

**Table 5**

Discrimination between women with Alzheimer's disease (AD) and age- and gender-corresponding controls on the basis of age of subjects and relevant circulating steroids measured by GC–MS only and analysis of the relationships between AD and the predictors using OPLS model and multiple regression.

Variable	OPLS, predictive component			Multiple regression	
	Component loading	t-Statistic	R <sup>2</sup>	Regression coefficient	t-Statistic
Relevant predictors					
Age (↑)	0.376	4.39	0.659 <sup>**</sup>	0.185	2.60 <sup>*</sup>
Pregnenolone (↑)	0.343	4.57	0.601 <sup>**</sup>	0.064	1.04
Pregnenolone sulfate (↑)	0.247	2.12	0.433 <sup>*</sup>	0.066	1.59
16 $\alpha$ -Hydroxypregnenolone (↑)	0.271	3.70	0.475 <sup>**</sup>	0.086	1.42
16 $\alpha$ -Hydroxyprogesterone (↑)	0.282	3.52	0.494 <sup>**</sup>	0.087	1.76
20 $\alpha$ -Dihydroprogesterone	0.188	1.66	0.329	0.090	1.79
Conjugated pregnanolone (↑)	0.246	2.42	0.432 <sup>*</sup>	0.102	1.49
Conjugated 5 $\beta$ -pregnane-3 $\alpha$ ,20 $\alpha$ -diol (↑)	0.347	4.22	0.609 <sup>**</sup>	0.171	5.57 <sup>**</sup>
Epiandrosterone sulfate (↓)	−0.304	−1.86	−0.533	−0.221	−3.31 <sup>**</sup>
5 $\alpha$ -Androstane-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol sulfate (↓)	−0.417	−3.29	−0.731 <sup>**</sup>	−0.218	−6.90 <sup>**</sup>
5 $\beta$ -Androstane-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol sulfate (↓)	−0.234	−2.24	−0.410 <sup>*</sup>	−0.122	−2.77 <sup>*</sup>
Predicted variable	AD, LLR <sup>b</sup>	1.000	7.82	0.778 <sup>**</sup>	
Explained variability		60.6% (49.4% after cross-validation)			
Discrimination between women with AD and controls (estimates with 95% confidence limits)				Sensitivity = 0.875 (0.640, 0.965) Specificity = 0.909 (0.713, 0.975)	

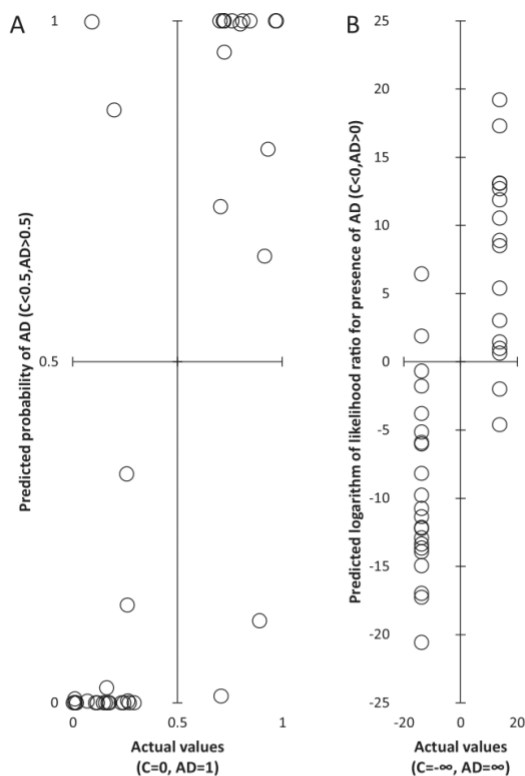
↑ and ↓ represent increased and decreased values in AD patients, respectively.

<sup>\*</sup>  $p < 0.05$ .

<sup>\*\*</sup>  $p < 0.01$ .

<sup>a</sup> R...Component loadings expressed as a correlation coefficients with predictive component.

<sup>b</sup> Logarithm of the ratio of probability of AD presence to probability of AD absence.



**Fig. 5.** Discrimination of women with Alzheimer's disease (AD) from age- and gender-related controls (C) on the basis of circulating steroids measured by GC–MS and using orthogonal projections to latent structures for the evaluation. Panel A illustrates the comparison of probability of pathology presence with the actual state, while in Panel B there are logarithms of the ratios of probability that the subject is a patient to probability that the subject is a control (logarithm of the likelihood ratio, LLR). Both panels show a good discrimination of patients from controls and good agreement between predictions and actual values in both patients (actual probability of AD = 1, LLR =  $\infty$ ) and controls (actual probability of AD = 0, LLR =  $-\infty$ ). Only 4 subjects from 38 were falsely predicted (2 controls and 2 patients). Sensitivity of the model was 0.875 (0.640, 0.965) and specificity was 0.909 (0.722, 0.975) (shown as estimates with 95% confidence limits).

epiandrosterone ratio. The aforementioned shift is catalyzed by HSD17Bs types 3, 1, 7, and AKR1Cs type 3 and 1 in the 17 $\beta$ -direction and by HSD17Bs types 6 and 2 in the 17-oxo-direction.

Three ratios reflecting a shift from the 3 $\beta$ -hydroxy-5 $\alpha$ / $\beta$ -reduced C19 steroids to their 3 $\alpha$ -hydroxy-counterparts (catalyzed by AKR1C4,2,3,1 in the 3 $\alpha$ -direction and by HSD17B6 in the 3 $\beta$ -direction) such as the etiocholanolone sulfate/epiandrosterone sulfate ratio, 5 $\alpha$ -androstane-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol/5 $\alpha$ -androstane-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol ratio, and conjugated 5 $\alpha$ -androstane-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol/5 $\alpha$ -conjugated androstane-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol ratio were higher in the patients.

The results were not consistent in the ratios reflecting a shift from the 20-oxo-5 $\alpha$ / $\beta$ -reduced C21 steroids to their 20 $\alpha$ -hydroxy-counterparts catalyzed by AKR1C1 in the 20 $\alpha$ -direction and by HSD17B2 in the 20-oxo-direction. While the of 20 $\alpha$ -dihydroprogesterone sulfate/pregnenolone sulfate ratio showed higher values in patients, the 20 $\alpha$ -dihydroprogesterone/progesterone ratio and conjugated 5 $\beta$ -pregnane-3 $\alpha$ ,20 $\alpha$ -diol/conjugated pregnanone ratio were lower in the AD group.

The female AD patients showed lower values of 5-androstene-3 $\beta$ ,7 $\alpha$ ,17 $\beta$ -triol/androstenediol ratio reflecting the CYP7B1 activity.

### 3.2.2. ROC analysis

Table 7 shows significant AUCs between women with AD and age- corresponding controls in some PPRs reflecting balances between steroids and/or activities of steroidogenic enzymes even if the predictive value of the respective cut-off values were not so high ranging from 0.676 to 0.795. Some C/U ratios such as epiandrosterone C/U, androstenediol C/U, and 5 $\alpha$ -androstane-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol C/U were lower in the patients as well as the DHEA/17-hydroxypregnenolone ratio reflecting the activity of C17,20-lyase and DHEAS/pregnenolone sulfate ratio reflecting the overall activity of both 17-hydroxylase and C17,20-lyase. On the other hand, the values of 17-hydroxypregnenolone/pregnenolone ratio reflecting the 17-hydroxylase activity were higher in AD group but the ratios reflecting HSD3B2 activity such progesterone/pregnenolone ratio and 17-hydroxyprogesterone/17-hydroxypregnenolone were lower in the AD patients.

The AD patients had also significantly lower androsterone sulfate/etiocholanolone sulfates ratio reflecting the balance between SRD5As and AKR1D1 activities but the ratios reflecting a balance between 3 $\alpha$ - and 3 $\beta$ -hydroxy-5 $\alpha$ / $\beta$ -reduced C19 steroids such as etiocholanolone sulfate/epiandrosterone sulfate ratio and conjugated 5 $\alpha$ -androstane-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol/conjugated 5 $\alpha$ -androstane-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol (in MR model only) ratio were lower in the AD group. Alternatively, there was lower 5-Androstene-3 $\beta$ ,7 $\alpha$ ,17 $\beta$ -triol/7 $\alpha$ -hydroxy-DHEA ratio reflecting the balance between 17 $\beta$ -hydroxy and 17-oxo C19 steroids. Contradictory results were noted concerning ratios reflecting the balance between 20 $\alpha$ -hydroxy and 20-oxo pregnane steroids with lower 20 $\alpha$ -dihydroprogesterone sulfate/pregnenolone sulfate ratio but higher 20 $\alpha$ -dihydroprogesterone/progesterone ratio in the AD patients.

In the AD patients, we also recorded lower 5-androstene-3 $\beta$ ,7 $\alpha$ ,17 $\beta$ -triol/androstenediol ratio reflecting CYP7B1 activity as well as lower ratio of 5-androstene-3 $\beta$ ,7 $\beta$ ,17 $\beta$ -triol/androstenediol reflecting the activities of 7 $\beta$ -hydroxylating enzymes CYP3A4 and CYP3A7.

### 3.2.3. OPLS and multiple regression model

As expected, the highest number of significant results concerning the relationships between PPRs and AD presence were obtained using the OPLS model and multiple regression (Table 8). The presence of AD was positively correlated with age, negatively with C/U ratios of various C19 steroids such as DHEA, androsterone, epiandrosterone, androstenediol, 5 $\alpha$ -androstane-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol, and 5 $\alpha$ -androstane-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol. Furthermore, the presence of AD negatively correlated with DHEA/17-hydroxypregnenolone ratio reflecting the activity of C17,20-lyase and DHEA/pregnenolone (in the OPLS model only), 16 $\alpha$ -hydroxy-DHEA/16 $\alpha$ -hydroxypregnenolone (in MR model only), and DHEAS/pregnenolone sulfate ratios reflecting the overall activities of both 17-hydroxylase and C17,20-lyase. On the other hand, there was a positive correlation of 17-hydroxypregnenolone/pregnenolone ratio reflecting the 17-hydroxylase activity with the presence of AD. The progesterone/pregnenolone and 17-Hydroxyprogesterone/17-hydroxypregnenolone ratios reflecting HSD3B2 activity were negatively correlated with AD presence.

Concerning the PPRs reflecting the associations of SRD5As with AD, there were contradictory results showing negative correlation of AD presence with androsterone sulfate/etiocholanolone sulfate ratio. This steroid ratio, reflecting the balance between SRD5As and AKR1D1 activities was significant in both OPLS and MR models. Alternatively, there was a positive association between 5 $\alpha$ -

**Table 6**

Differences between women with Alzheimer's disease (AD) and gender- and age-corresponding controls in the relevant steroid product to precursor ratios of circulating steroids measured by GC–MS or RIA (only the ratios with significant differences between AD patients and controls are shown).

Product to precursor ratios	Mean (95% confidence interval)		AD <sup>a</sup>		Enzyme
	AD	Controls	F	p	
Androstenediol C/U (↓)	250 (177, 349)	559 (430, 724)	6.6	0.015	SULT2A1
17-Hydroxypregnenolone/pregnenolone (↑)	2.43 (1.46, 4.12)	0.661 (0.434, 1)	7.1	0.011	CYP17A1 (17-hydroxylase)
DHEA/17-hydroxypregnenolone (↓)	1.51 (0.971, 2.33)	9.62 (6.65, 14.1)	19.5	<0.001	CYP17A1 (C17,20-lyase)
DHEA/pregnenolone, sulfates (↓)	10.4 (8.23, 12.7)	16 (13.8, 18.2)	5.4	0.026	CYP17A1 (17-hydroxylase, C17,20-lyase)
Progesterone/pregnenolone (↓)	0.243 (0.19, 0.314)	0.434 (0.346, 0.551)	5.1	0.03	HSD3B2
17-Hydroxyprogesterone/17-hydroxypregnenolone (↓)	0.592 (0.342, 1.01)	2.29 (1.48, 3.54)	7	0.012	HSD3B2
Estrone/androstenedione (↓)	0.039 (0.03, 0.049)	0.080 (0.068, 0.095)	11.1	0.002	CYP19A1
Etiocolanalone/epiatiocolanalone, sulfates (↑)	2.77 (2.25, 3.43)	1.71 (1.45, 2.03)	5.8	0.022	AKR1C4,2,3,1/HSD17B6 3 $\alpha$ / $\beta$ <sup>b</sup>
5 $\alpha$ -Androstane-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol/5 $\alpha$ -androstane-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol (↑)	1.48 (0.884, 2.38)	0.481 (0.289, 0.771)	4.7	0.038	AKR1C4,2,3,1/HSD17B6 3 $\alpha$ / $\beta$ <sup>b</sup>
5 $\alpha$ -Androstane-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol/5 $\alpha$ -androstane-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol, conjugates (↑)	0.471 (0.33, 0.641)	0.179 (0.113, 0.263)	6.1	0.019	AKR1C4,2,3,1/HSD17B6 3 $\alpha$ / $\beta$ <sup>b</sup>
5 $\beta$ -Androstane-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol/etiocolanalone, conjugates (↓)	0.136 (0.117, 0.159)	0.194 (0.171, 0.22)	5.8	0.022	HSD17B3,1,7, AKR1C3,1/HSD17B6,2 17 $\beta$ /oxo <sup>b</sup>
5 $\alpha$ -Androstane-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol/epiandrosterone, conjugates (↓)	0.192 (0.157, 0.235)	0.291 (0.246, 0.345)	4.5	0.041	HSD17B3,1,7, AKR1C3,1/HSD17B6,2 17 $\beta$ /oxo <sup>b</sup>
20 $\alpha$ -Dihydropregnenolone/pregnenolone, sulfates (↓)	5.29 (4.61, 6.02)	7.3 (6.61, 8.04)	7.1	0.012	AKR1C1/HSD17B2 20 $\alpha$ /oxo <sup>b</sup>
20 $\alpha$ -Dihydroprogesterone/progesterone (↑)	0.961 (0.732, 1.26)	0.461 (0.363, 0.583)	7.5	0.01	AKR1C1/HSD17B2 20 $\alpha$ /oxo <sup>b</sup>
5 $\beta$ -Pregnane-3 $\alpha$ ,20 $\alpha$ -diol/pregnenolone, conjugates (↑)	13.3 (11.2, 16.1)	7.96 (6.95, 9.14)	9.6	0.004	AKR1C1/HSD17B2 20 $\alpha$ /oxo <sup>b</sup>
5-Androstene-3 $\beta$ ,7 $\alpha$ ,17 $\beta$ -triol/androstenediol (↓)	0.076 (0.062, 0.091)	0.117 (0.103, 0.131)	7.6	0.009	CYP7B1
Cortisol/17-hydroxyprogesterone (↓)	198 (107, 352)	991 (630, 1550)	8.9	0.005	CYP21A2, CYP11B1

↑ and ↓ represent increased and decreased values in AD patients, respectively. The steroid ratios were computed as previously illustrated elsewhere and/or on the basis of major steroid metabolic pathways as found in the literature and documented in the text of the manuscript. C/U represents the ratio of conjugated to unconjugated steroid.

<sup>a</sup> Factor presence of AD as evaluated by age-adjusted ANCOVA.

<sup>b</sup> Isoform shifting the balance towards the reductive and oxidative forms of steroids are before and after the slash, respectively.

dihydrotestosterone/testosterone ratio (in MR model only) reflecting the SRD5As activities and AD.

The ratios reflecting the balance between 3 $\alpha$ - and 3 $\beta$ -hydroxy-5 $\alpha$ / $\beta$ -reduced C19 steroids such as etiocolanalone sulfate/epiatiocolanalone sulfate ratio and conjugated 5 $\alpha$ -androstane-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol/conjugated 5 $\alpha$ -androstane-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol ratio were positively correlated with AD presence. On the other hand the 5 $\alpha$ -androstane-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol/5 $\alpha$ -dihydrotestosterone ratio (in the MR model only) reflecting the balance between the 3 $\beta$ -hydroxy and 3-oxo-5 $\alpha$ / $\beta$ -reduced C19 steroids showed negative correlation with AD presence in the MR model.

Positive correlation was found between AD presence and the 5-androstene-3 $\beta$ ,7 $\alpha$ ,17 $\beta$ -triol/7 $\alpha$ -hydroxy-DHEA ratio reflecting the balance between 17 $\beta$ -hydroxy and 17-oxo-C19 steroids.

Concerning the ratios reflecting the balance between 20 $\alpha$ -hydroxy- and 20-oxo- pregnane steroids we found negative correlation between 20 $\alpha$ -dihydropregnenolone sulfate/pregnenolone sulfate ratio and AD presence.

In the MR model we also recorded negative correlation of AD presence with 5-androstene-3 $\beta$ ,7 $\alpha$ ,17 $\beta$ -triol/androstenediol ratio reflecting CYP7B1 activity and negative correlation with cortisol/17-hydroxyprogesterone ratio reflecting the activities of enzymes CYP21A2 and CYP11B1 converting 17-hydroxyprogesterone to cortisol. The model explained 62.4% of variability in LLR of AD and the correlation between the status (patients vs. controls) and steroids in this model was slightly lower than the previous one with sensitivity=0.813 (0.570, 0.934) and specificity=0.909 (0.722, 0.975).

#### 4. Discussion

The main outcome of the study was finding an attenuated activity of adrenal *zona reticularis* in women with AD involving substantially weakened activity of CYP17A1 C17,20 lyase metabolic

step, attenuated sulfotransferase SULT2A1 activity at considerably higher activity of the CYP17A1 17-hydroxylase step. Nevertheless, the stimulation of the C17-hydroxylase results in only moderately elevated cortisol levels due to evident attenuation of HSD3B2 activity as well as markedly abated conversion of 17-hydroxyprogesterone to cortisol, which is catalyzed by CYP21A2 and CYP11B1.

Our data also indicated attenuated aromatase activity, shifts from the 3 $\beta$ -hydroxy-5 $\alpha$ / $\beta$ -reduced C19 steroids to their 3 $\alpha$ -hydroxy- counterparts, from 3 $\beta$ -hydroxy-5 $\alpha$ / $\beta$ -reduced C19 steroids to their 3-oxo- equivalents and from the 17 $\beta$ -hydroxy- to 17-oxo-C19 steroids, and perhaps altered SRD5As, AKR1Cs, and HSD17Bs activities in the AD patients. In addition, the attenuated 7 $\alpha$ -hydroxylation of  $\Delta^5$ -C19 steroids was recorded.

##### 4.1. Adrenal steroidogenesis

Transcriptome profiling quantitative RT-PCR (qPCR) demonstrated that human adrenal *zona fasciculata* exhibited significantly lower expression of **AKR1C3**, **SULT2A1**, and **CYB5** but significantly higher expression of **HSD3B2** when compared to adrenal *zona reticularis* (ratios of expression in *zona fasciculata* to expression in *zona reticularis* for important enzymes of adrenal steroidogenesis were as follows StAR = 1.0  $\pm$  0.04, CYP11A1 = 0.7  $\pm$  0.04, **HSD3B2** = 6.2  $\pm$  2.1, CYP21A2 = 1.3  $\pm$  0.2, CYP11B1 = 1.3  $\pm$  0.2, CYP17A1 = 0.9  $\pm$  0.1, POR = 1.0  $\pm$  0.03, **CYB5** = 0.1  $\pm$  0.02, **AKR1C3** = 0.5  $\pm$  0.1, **SULT2A1** = 0.4  $\pm$  0.1) [109]. As documented further in the text, our data in AD patients showed pronouncedly elevated CYP17A1 activity in the C17-hydroxylase step, but suppressed CYP17A1 activity in the C17,20-lyase step, which is in line with the suppressed production of CYB5 in the *zona reticularis* as the attenuation of CYB5 activity probably induces a shrinking of *zona reticularis* with increasing age [110]. This finding is also in agreement with the results of Ueshiba et al. reported for patients with type 2 diabetes [69]. We also found a shift from conjugated to



**Table 8**

Discrimination between women with Alzheimer's disease (AD) and age- and gender-corresponding controls on the basis of age of subjects and steroid product to precursor ratios of circulating steroids measured by GC–MS or RIA and analysis of the relationships between AD and the predictors using OPLS model and multiple regression.

Variable	OPLS, predictive component			Multiple regression		
	Component loading	t-Statistic	R <sup>2</sup>	Regression coefficient	t-statistic	Enzyme
Relevant predictors						
Age (↑)	0.214	4.59	0.525 <sup>***</sup>	0.084	2.59 <sup>*</sup>	-----
DHEA, C/U (↓)	-0.209	-2.58	-0.513 <sup>*</sup>	-0.048	-1.85	SULT2A1
Androsterone, C/U (↓)	-0.273	-3.47	-0.670 <sup>**</sup>	-0.061	-3.17 <sup>**</sup>	SULT2A1
Epiandrosterone, C/U (↓)	-0.274	-6.42	-0.673 <sup>**</sup>	-0.075	-4.58 <sup>**</sup>	SULT2A1
Androstenediol, C/U (↓)	-0.190	-2.11	-0.465 <sup>*</sup>	-0.059	-2.51 <sup>*</sup>	SULT2A1
5α-Androstane-3α,17β-diol, C/U (↓)	-0.162	-2.59	-0.397 <sup>*</sup>	-0.042	-1.90 <sup>*</sup>	SULT2A1
5α-Androstane-3β,17β-diol, C/U (↓)	-0.232	-4.98	-0.569 <sup>**</sup>	-0.054	-3.21 <sup>**</sup>	SULT2A1
17-Hydroxypregnenolone/pregnenolone (↑)	0.272	5.18	0.667 <sup>**</sup>	0.072	3.64 <sup>**</sup>	CYP17A1, 17-hydroxylase
DHEA/17-hydroxypregnenolone (↓)	-0.326	-7.80	-0.799 <sup>**</sup>	-0.091	-4.60 <sup>**</sup>	CYP17A1, C17,20-lyase
DHEA/pregnenolone (↓)	-0.180	-3.43	-0.443 <sup>**</sup>	-0.047	-2.75 <sup>*</sup>	CYP17A1, 17-hydroxylase, C17,20-lyase
DHEAS/pregnenolone, sulfates (↓)	-0.260	-3.15	-0.637 <sup>**</sup>	-0.081	-3.50 <sup>**</sup>	CYP17A1, 17-hydroxylase, C17,20-lyase
16α-Hydroxy-DHEA/16α-hydroxypregnenolone (↓)	-0.091	-1.27	-0.223	-0.029	-2.04 <sup>*</sup>	CYP17A1, 17-hydroxylase, C17,20-lyase
Progesterone/pregnenolone	-0.230	-2.32	-0.563 <sup>*</sup>	-0.069	-1.90 <sup>*</sup>	HSD3B2
17-Hydroxyprogesterone/17-hydroxypregnenolone (↓)	-0.294	-4.55	-0.722 <sup>**</sup>	-0.073	-3.08 <sup>**</sup>	HSD3B2
(3α/β-Hydroxy-5α-pregnane-20-ones)/progesterone	0.099	1.03	0.243	0.052	1.63	SRD5As
5α-Dihydrotestosterone/testosterone (↑)	0.083	1.18	0.205	0.046	2.48 <sup>*</sup>	SRD5As
Androsterone/etiocholanolone, sulfates (↓)	-0.177	-2.29	-0.435 <sup>*</sup>	-0.050	-1.99 <sup>*</sup>	SRD5As/AKR1D1
Etiocholanolone/epietiocholanolone, sulfates (↑)	0.227	4.36	0.557 <sup>**</sup>	0.084	3.68 <sup>**</sup>	AKR1C4,2,3,1/HSD17B6 3α/β <sup>c</sup>
5α-Androstane-3α,17β-diol/5α-androstane-3β,17β-diol, conjugates (↑)	0.104	1.42	0.254	0.058	2.37 <sup>*</sup>	AKR1C4,2,3,1/HSD17B6 3α/β <sup>c</sup>
5α-Androstane-3β,17β-diol/5α-dihydrotestosterone (↑)	-0.110	-1.82	-0.269	-0.046	-3.03 <sup>**</sup>	HSD17B6 3β/oxo <sup>c</sup>
5-Androstene-3β,7α,17β-triol/7α-hydroxy-DHEA (↓)	-0.177	-2.96	-0.434 <sup>**</sup>	-0.067	-2.44 <sup>*</sup>	HSD17B3,1,7, AKR1C3,1/HSD17B6,2 17β/oxo <sup>c</sup>
20α-Dihydroprogesterone/progesterone	0.083	0.88	0.203	0.064	1.87	AKR1C1/HSD17B2 20α/oxo <sup>c</sup>
20α-Dihydropregnenolone/pregnenolone, sulfates (↓)	-0.185	-2.26	-0.453 <sup>*</sup>	-0.069	-3.24 <sup>**</sup>	AKR1C1/HSD17B2 20α/oxo <sup>c</sup>
5-Androstene-3β,7α,17β-triol/androstenediol (↓)	-0.101	-1.19	-0.248	-0.065	-1.90 <sup>*</sup>	CYP7B1
Cortisol/17-hydroxyprogesterone (↓)	-0.294	-5.43	-0.722 <sup>**</sup>	-0.078	-3.01 <sup>**</sup>	CYP21A2, CYP11B1
Predicted variable	AD, LLR <sup>b</sup>	1.000	11.96	0.790 <sup>**</sup>		

↑ and ↓ represent increased and decreased values in AD patients, respectively. C/U represents the ratio of conjugated to unconjugated steroid.

\*  $p < 0.05$ .

\*\*  $p < 0.01$ .

<sup>a</sup> R . . . Component loadings expressed as a correlation coefficients with predictive component.

<sup>b</sup> Logarithm of the ratio of probability of AD presence to probability of AD absence.

<sup>c</sup> Isoform shifting the balance towards the reductive and oxidative forms of steroids are before and after the slash, respectively.

free steroids in AD patients most probably due to reduced SULT2A1 activity. A reduced activity of HSD3B2 for the C21 steroids and suppressed conversion of 17-hydroxyprogesterone to cortisol were observed in the AD patients.

#### 4.1.1. Zona fasciculata

The data of the current study indicated intensified synthesis of cortisol precursors in the primary  $\Delta^5$  steroidogenic pathway, particularly in the C17-hydroxylase step but markedly reduced activities of HSD3B2 and further enzymes metabolizing the abundant 17-hydroxypregnenolone to cortisol. Cortisol levels significantly positively correlated with AD presence but they were only slightly higher in AD group (598 (530, 676) nmol/L) when compared with controls (503 (456, 556) nmol/L, mean with 95% confidence limits). This difference reached significance when using ROC analysis but not ANCOVA (Tables 2–4). The above mentioned results are in accordance with the data from other authors who also reported elevated cortisol levels in serum [111,112] and cerebrospinal fluid [103] of patients with AD (Fig. 1).

**4.1.1.1. Higher CYP11A1 activity in women with AD.** Higher levels of circulating pregnenolone, pregnenolone sulfate (the first steroids in the steroidogenic cascade) and 17-hydroxypregnenolone (pregnenolone direct metabolite) may indicate augmented adrenal cholesterol desmolase (CYP11A1) activity in *zona fasciculata* of the AD patients (see Tables 2–5) in spite of less active pregnenolone sulfation in *zona reticularis* of the AD group [109,113].

**4.1.1.2. Pronouncedly higher CYP17A1, steroid C17-hydroxylase activity in women with AD.** Adrenal *zona fasciculata* expresses substantially less cytochrome b5 than *zona reticularis* and therefore primarily favors the C17-hydroxylase step in CYP17A1 converting the pregnenolone (and its sulfate) to 17-hydroxypregnenolone (and its sulfate) [76,109,113]. The AD patients had several times higher 17-hydroxypregnenolone levels (Tables 2–4) as well as the 17-hydroxypregnenolone/pregnenolone ratio reflecting the activity of CYP17A1C17-hydroxylase. Besides the alterations in the  $\Delta^5$  steroidogenic pathway (which is dominant in human [73]) also the levels of

17-hydroxypregnenolone metabolite 17-hydroxyprogesterone (the  $\Delta^4$  pathway) were significantly elevated in the AD patients (Fig. 1).

**4.1.1.3. Markedly lower HSD3B2 activity for C21 steroids but not for C19 steroids in women with AD.** In contrast to the higher C17-hydroxylase activity, the AD patients exhibited markedly lower HSD3B2 activity as documented by markedly higher 17-hydroxypregnenolone but only slightly (but still significantly) higher 17-hydroxyprogesterone levels (Tables 2–4). This was also supported by the lower progesterone/pregnenolone and 17-hydroxyprogesterone/17-hydroxypregnenolone ratios (Tables 6–8). On the other hand, the corresponding PPRs for C19 steroids such as androstenedione/DHEA ratio (0.287 (0.236, 0.358) nmol/L in AD female group (displayed as mean with 95% confidence limits) and 0.245 (0.212, 0.287) in controls) and (testosterone/androstenediol ratio 0.675 (0.472, 0.944) nmol/L in AD group and 0.839 (0.64, 1.09) in controls) did not significantly differ between the AD patients and controls. The finding of the attenuated HSD3B2 activity in C21 steroids might be associated with a deficiency in the functioning of the farnesoid X receptor, which increases the transcription and expression of HSD3B2 and consequently the capacity of the adrenal gland to produce corticosteroids [114].

**4.1.1.4. Manifestly suppressed conversion of 17-hydroxyprogesterone to cortisol in women with AD.** In addition to the lower HSD3B2 activity, the female patients with AD exhibited manifestly lower values of cortisol/17-hydroxyprogesterone ratio, reflecting the activities of enzymes CYP21A2 and CYP11B1, which subsequently convert the 17-hydroxyprogesterone to cortisol (Tables 6 and 8).

#### 4.1.2. Attenuated activity of zona reticularis in women with AD

As documented, the activities of key steroidogenic enzymes of adrenal *zona reticularis* are attenuated in the AD group, which indicates that the patients have even “older” *zona reticularis* than the age- and gender corresponding controls as the human exhibits shrinking *zona reticularis* with increasing age probably due to a reduction in the proportion of the adrenal cortex that expresses cytochrome B5 (CYB5) [110] (Fig. 1).

**4.1.2.1. Lower C17,20-lyase activity in women with AD.** The alterations in steroid biosynthesis in *zona reticularis* differed from that in *zona fasciculata* in women with AD. Although the levels of DHEA, androstenediol and their sulfates did not significantly differ between patients and controls (data not shown), the former did not follow the elevated levels of pregnenolone, its sulfate and 17-hydroxypregnenolone (Tables 2–4). Therefore, the DHEA/17-hydroxypregnenolone ratio reflecting the dominant C17,20 lyase activity as well as the ratios reflecting the overall conversion of 17-deoxy- C21 precursors to C19 steroids (DHEA/pregnenolone, 16 $\alpha$ -hydroxy-DHEA/16 $\alpha$ -hydroxypregnenolone, DHEA/pregnenolone sulfate) were lower in the AD patients (Tables 6–8). So, despite the absence of significant differences between C19  $\Delta^5$  steroids the above mentioned data demonstrating attenuated activity of *zona reticularis* in patients confirmed our previous results [54] and data from other studies reporting lower levels of C19  $\Delta^5$  steroids in body fluids of AD patients [111,115–117] (Fig. 1). In addition, our patients were in initial stages of the disease and therefore the alterations in peripheral steroidogenesis might be less pronounced than in more developed pathology.

The lower C17,20-lyase activity is also in line with the general trend to higher levels of 5 $\alpha$ / $\beta$ -reduced C21 steroids (allopregnanolone, allopregnanolone sulfate, isopregnanolone, pregnanone, conjugated pregnanone, and conjugated 5 $\beta$ -pregnane-3 $\alpha$ ,20 $\alpha$ -diol) and lower levels of their C19 equivalents (androsterone sulfate, epiandrosterone sulfate, epitiocolanolone sulfate,

conjugated 5 $\alpha$ -androstane-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol, and conjugated 5 $\beta$ -androstane-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol) in AD group. Besides the effect of low C17,20 lyase activity in the classical  $\Delta^5$  steroid pathway, these findings are in line with the concept of alternative “backdoor” pathway, the physiological importance of which was suggested not only for marsupials but also for human. The important metabolic step in this pathway is the conversion of 5 $\alpha$ -reduced C21 steroids to their C19 5 $\alpha$ -reduced equivalents, which is catalyzed by CYP17A1C17,20-lyase [35,36]. Our results showing higher levels of both 5 $\alpha$ - and 5 $\beta$ -reduced C21 steroids and at the same time reduced levels of both 5 $\alpha$ - and 5 $\beta$ -reduced C21 steroids indicate that the alternative “backdoor” pathway may include not only the 5 $\alpha$ -reduced steroids but also their 5 $\beta$ -reduced equivalents. The absence of differences between levels of C19  $\Delta^5$  steroids but significant differences in C19 5 $\alpha$ / $\beta$ -reduced steroids may be ascribed to the higher stability of the latter substances in the organism (Tables 2–4, Figs. 3 and 4)

**4.1.2.2. Lower steroid conjugation in women with AD.** In spite of the insignificant differences in the levels of conjugated C19  $\Delta^5$  steroids between AD group and controls, our results showed lower steroid conjugation in the patients most probably due to attenuated activity of SULT2A1, as documented by lower C/U ratios in the patients (Tables 6–8). SULT2A1 is dominantly expressed in *zona reticularis* and exhibits also about three times lower expression in liver [31] (Fig. 1).

Our data are in accordance with the results from Yanase et al. [53] who found lower DHEAS/DHEA ratio in the cerebrospinal fluid of AD patients. Furthermore, the stable sulfates of 5 $\alpha$ / $\beta$ -reduced catabolites of the C19  $\Delta^5$  steroids such as androsterone sulfate, epiandrosterone sulfate, epitiocolanolone sulfate, conjugated 5 $\alpha$ -androstane-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol, conjugated 5 $\beta$ -androstane-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol exhibited lower values in AD group compared to controls (Tables 3–5).

Nevertheless, despite the reduced SULT2A1 activity, the relative overproduction of C21 steroids is sufficient to maintain higher levels of C21 sulfates such as pregnenolone sulfate, allopregnanolone sulfate, conjugated pregnanone, conjugated 5 $\beta$ -pregnane-3 $\alpha$ ,20 $\alpha$ -diol in AD group (Tables 2–5). The balance between unconjugated and conjugated steroids is also of interest in GABAergic steroids as at least C21 3 $\alpha$ -hydroxy-5 $\alpha$ / $\beta$ -reduced steroids exhibit a turnaround of their GABAergic effect by sulfation [118] and lower SULT2A1 activity shifts a balance from negative modulators of GABA<sub>A</sub>R to the neuroinhibitory positive ones.

**4.1.2.3. Importance of  $\Delta^5$  steroids in human physiology and pathophysiology.** DHEA sulfate and further  $\Delta^5$  steroids, which are primarily produced in the *zona reticularis* are considered as “favorable” substances regarding the pathophysiology of AD. Besides the neuro-stimulatory, memory-, and learning enhancing actions, the  $\Delta^5$  steroids and their 7 $\alpha$ / $\beta$ - and 16 $\alpha$ -hydroxy-metabolites are also known as neuroprotective and immunoprotective substances [67,98,119–122]. In the CRH test, DHEA sulfate exhibits lower response in AD patients when compared to controls [111]. The authors of the aforementioned study suggest an association of higher DHEA sulfate levels in these patients with a decreased phosphorylation of hypothalamic  $\tau$ -proteins. Pre-administration of DHEA, DHEA sulfate and pregnenolone sulfate decelerates the increase of  $\beta$ -amyloid peptide induced by intracellular calcium [Ca<sup>2+</sup>]; [15]. Furthermore, pregnenolone sulfate levels negatively correlate with the concentrations of  $\beta$ -amyloid peptide in the striatum and cerebellum. Additionally, AD patients with higher circulating DHEA show better score in the Rivermead Behavioural Memory Test [123]. However, besides the mostly negative associations of low DHEA sulfate and DHEA levels with the manifestation of AD,

the DHEA treatment does not improve cognitive ability in AD patients [124] and there is also a study reporting higher levels of  $\Delta^5$  steroids in brain tissues collected post-mortem from the patients [125].

The levels of pregnenolone sulfate are higher in the patients which might have physiological and pathophysiological consequences as this steroid conjugate is a recognized neuroactive steroid. Pregnenolone sulfate is even more potent neuroexcitatory positive modulator of NMDA receptors than the DHEAS but might be excitotoxic on NMDA receptors [126]. On the other hand, pregnenolone sulfate may be also neuroprotective as it attenuates the activity of AMPA/kainate receptors [127], which participate in the pathophysiology of some CNS disturbances including AD [128,129].

#### 4.2. Elevated levels of androstenedione but not testosterone in women with AD

Although the synthesis of the C19  $\Delta^5$  steroids in *zona reticularis* is probably hindered and HSD3B2 activity in C21 steroids is suppressed, the levels of the important  $\Delta^4$  androgen androstenedione are surprisingly elevated in the patients (Table 2). This finding is in line with the data from other authors who reported higher androstenedione (but not testosterone) levels in women with AD [130] and higher response of androstenedione to ACTH (1  $\mu$ g) in AD patients [131]. Nevertheless, the higher androstenedione levels are in contradiction with the lower levels of its catabolites, conjugated C19  $5\alpha/\beta$ -reduced steroids. However, this discrepancy might be associated with low CYP17A1C17-hydroxylase activity in “backdoor” pathway from  $5\alpha/\beta$  reduced C21 steroids to their C19 counterparts [35,36] (Figs. 1–4). The significant difference for androstenedione and its absence for testosterone might be also ascribed to attenuated activity of AKR1C3. This enzyme is expressed in both *zona fasciculata* and *zona reticularis* but exhibits twice as high expression in the latter adrenal zone [109].

#### 4.3. Elevated levels of neuroprotective pregnane steroids in women with AD

Our data showed that there is unfavorable attenuation of *zona reticularis* at intensification of *zona fasciculata* activity. On the other hand, the raised CYP17A1C17-hydroxylase activity and reduced CYP17A1C17,20 lyase activity probably stimulate the synthesis of neuroprotective GABAergic steroids allopregnanolone and pregnanolone [132] and further  $3\alpha/\beta$ -hydroxy- $5\alpha/\beta$ -reduced C21 steroids (allopregnanolone sulfate, isopregnanolone, conjugated pregnanolone, conjugated  $5\beta$ -pregnane- $3\alpha,20\alpha$ -diol) (Tables 2–5, Figs. 1 and 2). From these steroids the pregnanolone sulfate represents the most abundant conjugated pregnanolone isomer [133] operating as a neuroinhibitory substance on NMDA and AMPA/kainate receptors [134]. In addition, the sulfated  $3\alpha$ -hydroxy- $5\alpha/\beta$ -reduced pregnane steroids pregnanolone and particularly allopregnanolone (which is effective at pharmacologically relevant concentrations) might mitigate inflammatory and neuropathic pain via inhibition of the voltage-gated sodium channels [135].

Allopregnanolone also promoted regeneration and reduced  $\beta$ -amyloid negative effect in a preclinical model of AD [136] and withdrew neurogenic and cognitive deficits in mouse model of AD [137].

Although Bernardi et al. [111] reported reduced circulating allopregnanolone in AD patients, our results demonstrated consistently increased levels of C21 steroids including their GABAergic C21  $5\alpha/\beta$ -reduced catabolites in AD group.

#### 4.4. Lower CYP19A1 (aromatase) activity in women with AD

Various studies reported low circulating levels of estradiol in women with AD (see review [138]). Although we did not find significant differences in estradiol and estrone levels between the AD group and controls our results indicated reduced aromatase activity in the AD group (Table 6) as the estrone/androstenedione ratio reflecting the CYP19A1 activity was lower in the AD patients. Concerning the estradiol but not estrone, our data are in line with the study from Cunningham et al. [130], who reported significantly higher levels for estrone but not estradiol in women with AD.

Estradiol levels in human female brain mirror circulating estradiol levels [20,23] and therefore, the loss of neuroprotective estradiol after menopause may increase the risk of AD [138]. Estradiol upregulates the formation of insulin degrading enzyme (IDE). The activity of IDE (decreasing with age) is negatively associated with the formation of  $\beta$ -amyloid plaques [139]. Furthermore, estradiol depletion leads to increased production of  $\beta$ -amyloid and  $\tau$ -phosphorylation, decreased dendritic spine density, and protection of the hippocampal neurons from kainate-induced excitotoxicity [138]. More recent data [140] showed a variety of positive estradiol effects such as stimulation of mitochondrial aerobic glycolysis, protection against free radicals, and increase of  $\beta$ -amyloid protein clearance. In addition, the ovariectomy in adult female 3xTg-AD mice induced an accumulation of  $\beta$ -amyloid and suppressed memory performance. Pretreatment with estradiol prevented these effects [141]. However, the long-term effect of estradiol in the pathophysiology of AD seems to be negative [142] particularly in senescence as estradiol may increase the leakiness of the blood–brain barrier [138].

Taken together, estradiol is a favorable substance in the healthy neurons but an undesirable one in the neurons impaired by AD, and therefore the reduced aromatase activity may be considered as a protective factor in subjects with manifested AD. Moreover, estradiol stimulates autoimmunity via estrogen receptors  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) and  $\beta$  (ER $\beta$ ) [96,97,143]. As the process of aging is associated with increased inflammation at concomitant immunodeficiency and autoimmunity status (autoimmunity plays an important role in the pathophysiology of AD [144]), the reduced aromatase activity may be favorable for the patients.

#### 4.5. Alterations in SRD5As and AKR1D1 activities

AKR1D1 and SRD5As are involved in the formation of neuroprotective GABAergic steroids and the sulfated  $5\alpha$ - and  $5\beta$ -reduced C21 steroids are either positive or negative modulators of glutamate responses on neuroexcitatory NMDA and AMPA/kainate receptors [145–147]. Therefore, the balance between the  $5\alpha$ - and  $5\beta$ -epimers may be of importance as regards the pathophysiology of AD. However, the data concerning the alterations in SRD5As and AKR1D1 activities in were ambiguous. Although both  $5\alpha$ - and  $5\beta$ -reduced C21 steroids in the AD patients consistently tended to higher circulating levels, both  $5\alpha$ - and  $5\beta$ -reduces C19 steroids consistently exhibited the opposite trend (Tables 2–5). Therefore, only the appropriate product to precursor ratios may demonstrate possible alterations in SRD5As and AKR1D1 activities of patients with AD. The differences in PPRs between patients and controls did not reach significance in the ANOVA testing but the androsterone sulfate/etiocholanolone sulfate ratio (reflecting the relation between SRD5As activities and AKR1D1 activity) was significantly lower in AD group when using ROC analysis as well as OPLS and MR models (Tables 7 and 8, Figs. 2 and 3). While there was no significant difference in the (etiocholanolone + epietiocholanolone)/androstenedione ratio reflecting the AKR1D1 activity (data not shown) the former PPRs might indicate attenuated SRD5As activities in the AD group. However, the  $5\alpha$ -dihydrotestosterone/

testosterone ratio also reflecting the SRD5As activities was higher in the MR model and indicated the opposite trend (Table 8). However, these findings need further confirmation.

#### 4.6. Balances between AKR1Cs, reductive HSD17Bs isoforms and oxidative HSD17Bs isoforms

##### 4.6.1. The balance between 3 $\alpha$ -hydroxy- and 3 $\beta$ -hydroxy-epimers of 5 $\alpha$ / $\beta$ -reduced steroids is shifted towards the 3 $\alpha$ -hydroxy-epimers in women with AD

The balance between 3 $\alpha$ -hydroxy- and 3 $\beta$ -hydroxy-epimers of 5 $\alpha$ / $\beta$ -reduced steroids is important for the biological activity of these substances because the 3 $\alpha$ -hydroxy-epimers are neuro-inhibitory and neuroprotective positive modulators of type A GABA receptors, while the 3 $\beta$ -ones are either inactive or function as negative modulators of these receptors in unconjugated [148] and even more in sulfated form [118,149]. Thus, the balance between 3 $\alpha$ -hydroxy- and 3 $\beta$ -hydroxy-epimers may have pathophysiological importance in both CNS [150] and periphery [151,152]. As mentioned, the sulfated C21 3 $\alpha$ -hydroxy-5 $\alpha$ / $\beta$ -reduced steroids but not their sulfated 3 $\beta$ -equivalents may alleviate inflammation and neuropathic pain via inhibition of the voltage-gated sodium channels [135]. The C19 3 $\alpha$ -hydroxy-5 $\alpha$ / $\beta$ -reduced steroids exert antiepileptic effect inducing an expression of Calbindin-D28k protein, which modulates the intracellular Ca<sup>2+</sup> in the nervous system. Three PPRs reflecting the balance between 3 $\alpha$ -hydroxy- and 3 $\beta$ -hydroxy-epimers of C19 5 $\alpha$ / $\beta$ -reduced steroids (etiocholanolone sulfate/epi-etiocholanolone sulfate, 5 $\alpha$ -androstane-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol/5 $\alpha$ -androstane-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol ratio, and conjugated 5 $\alpha$ -androstane-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol/conjugated 5 $\alpha$ -androstane-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol) showed a shift towards the 3 $\alpha$ -hydroxy-epimers in AD group, which might be favorable for the patients. However, an analogy with this finding in C21 5 $\alpha$ / $\beta$ -reduced steroids was not observed (Tables 6–8).

##### 4.6.2. The balance between 17 $\beta$ -hydroxy and 17-oxo steroids in women with AD is shifted towards 17-oxo-steroids

We did not find significant differences in estradiol/estrone ratio between AD patients and controls. Although we recorded steroid ratios (conjugated 5 $\beta$ -androstane-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol/conjugated etiocholanolone and conjugated 5 $\alpha$ -androstane-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol/conjugated epiandrosterone) indicating a slight shift from the C19 17 $\beta$ -hydroxy-5 $\alpha$ / $\beta$ -reduced steroids towards their 17-oxo-counterparts (Table 6) the physiological interpretation of this finding needs further investigation (Figs. 2 and 3).

##### 4.6.3. The balance between 20 $\alpha$ -hydroxy and 20-oxo-steroids

As mentioned the results were not consistent in the ratios reflecting a shift from the 20-oxo-5 $\alpha$ / $\beta$ -reduced steroids to their 20 $\alpha$ -hydroxy-counterparts. The higher 20 $\alpha$ -dihydroprogesterone/progesterone ratio (Tables 6 and 7) indicated a shift from neuroprotective progestogen progesterone [153] towards its inactive metabolite 20 $\alpha$ -dihydroprogesterone in patients. Concerning the lower 20 $\alpha$ -dihydropregnenolone sulfate/pregnenolone sulfate ratio in AD group, the shift from pregnenolone sulfate (active on GABA<sub>A</sub>R and NMDAR) towards its less active 20 $\alpha$ -dihydro-metabolite in AD patients might be of physiological importance [118,154]. NMDAR is a therapeutic target for AD treatment [155]. Alzheimer's disease is also characterized by decreased AMPA activation and synapse loss [129]. The augmentation of AMPA receptors at the synapses by transmembrane AMPA receptor regulatory proteins (TARPs) alleviate the symptoms of AD and pregnenolone sulfate is the AMPA receptor antagonist, its catabolism to 20 $\alpha$ -hydroxy-counterpart might be favorable for AD patients [129].

#### 4.7. Reduced activities of CYP7B1 catalyzing the formation of immunomodulatory 7 $\alpha$ -hydroxy-metabolite of androstenediol in women with AD

Concerning the specific role of enzymes catalyzing the formation of immunomodulatory metabolites of  $\Delta^5$  steroids in the pathophysiology of AD, the expression of CYP7B1 mRNA in the hippocampi of AD patients is reduced by 50% [156]. A number of studies from Morfin's group and other researchers demonstrated that 7 $\alpha$ / $\beta$ -hydroxy-C19  $\Delta^5$  steroids may compete for the active sites on type 1 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase (HSD11B1), the enzyme catalyzing the conversion of inactive 11-oxo-glucocorticoids to immunosuppressive 11 $\beta$ -hydroxy-glucocorticoids [67,119–122]. Interestingly, besides various tissues, also human lymphocytes express the HSD11B1 [157]. Moreover, CYP7B1 enzyme rapidly catabolizes C19 estrogen precursors such as DHEA, androstenediol, and 5 $\alpha$ -androstane-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol (the latter steroids are also estrogenic) to their corresponding 7 $\alpha$ -oxygenated and 16 $\alpha$ -hydroxylated catabolites, which cannot be further converted to autoimmunity-inducing estradiol [96,97,143]. Even low androstenediol concentrations are effective on both ER $\alpha$  and ER $\beta$  and therefore the conversion of androstenediol into 5-androstene-3 $\beta$ ,7 $\alpha$ ,17 $\beta$ -triol results in loss of estrogenic action. More recent studies showed that there is no influence of DHEA to 7 $\alpha$ -hydroxy-DHEA conversion on the function of ER-mediated response as previously indicated but the conversion of androstenediol to 5-androstene-3 $\beta$ ,7 $\alpha$ ,17 $\beta$ -triol is effective [97]. The 5-androstene-3 $\beta$ ,7 $\alpha$ ,17 $\beta$ -triol epimer 5-androstene-3 $\beta$ ,7 $\beta$ ,17 $\beta$ -triol (which may be either formed by interconversion from the former steroid or directly from androstenediol by the catalytic action of CYP3A4) is highly immunoprotective despite its rapid catabolism and high clearance from human circulation [98].

Our data showed decreased 5-androstene-3 $\beta$ ,7 $\alpha$ ,17 $\beta$ -triol/androstenediol ratio (controls: 0.0757 (0.0616, 0.0905) nmol/L, AD patients: 0.117 (0.103, 0.131) nmol/L, mean with 95% confidence limits) and 7 $\alpha$ -hydroxy-DHEA/DHEA ratio (controls: 0.0491 (0.0431, 0.0556) nmol/L, patients: 0.0599 (0.0541, 0.0661) nmol/L) reflecting the activity of CYP7B1 enzyme even if the second one did not reach significance (Tables 6–8). Therefore, our findings and data from others [156] indicated that the attenuated CYP7B1 activity may also participate in the pathophysiology of AD (Fig. 4).

## 5. Conclusions

Our preliminary data indicated substantially altered adrenal steroidogenesis in women with AD. The female patients had increased cholesterol desmolase CYP11A1 activity, substantially weakened activity of CYP17A1C17,20 lyase metabolic step and attenuated sulfotransferase SULT2A1 activity at considerably higher activity of the CYP17A1 17-hydroxylase step. On the other hand, the patients showed diminished HSD3B2 activity for C21 steroids and markedly abated conversion of 17-hydroxyprogesterone to cortisol and therefore only slightly elevated cortisol levels.

The women with AD had also attenuated steroid 7 $\alpha$ -hydroxylation (CYP7B1) catalyzing the formation of immunoprotective  $\Delta^5$ -C19 steroids and attenuated aromatase activity (which forms estradiol that induces autoimmunity) and a shift from the 3 $\beta$ -hydroxy-5 $\alpha$ / $\beta$ -reduced C19 steroids to their neuroinhibitory and anti-inflammatory GABAergic 3 $\alpha$ -hydroxy-counterparts. The patients' population showed higher levels of the 3 $\alpha$ -hydroxy-5 $\alpha$ / $\beta$ -reduced C21 steroids and pregnenolone sulfate, which improves cognitive abilities and at the same time may act as a protective substance on AMPA/kainate receptors but may be excitotoxic via stimulation of NMDAR.

Furthermore, our data indicated functioning of an alternative "backdoor" pathway, the physiological importance of which was

suggested not only in marsupials but also in humans. The important metabolic step in this pathway is the conversion of 5 $\alpha$ -reduced C21 steroids to their C19 5 $\alpha$ -reduced equivalents catalyzed by CYP17A1C17-lyase. Our results showing higher levels of both 5 $\alpha$ - and 5 $\beta$ -reduced C21 steroids and at the same time reduced levels of both 5 $\alpha$ - and 5 $\beta$ -reduced C21 steroids indicated that the alternative “backdoor” pathway may include not only the 5 $\alpha$ -reduced steroids but also their 5 $\beta$ -reduced equivalents. Although the absence of a direct experiment is a limitation of our study, we believe that our results support the conclusions mentioned above.

### Acknowledgement

This study was supported by the grant IGA NT/13543-4 of the Czech Ministry of Health.

### References

- [1] M. Prince, E. Albanese, M. Guerchet, M. Prina, World Alzheimer Report, Alzheimer's Disease International, London, England, 2014.
- [2] D.M. Holtzman, J.C. Morris, A.M. Goate, Alzheimer's disease: the challenge of the second century, *Sci. Transl. Med.* 3 (2011) 77s1.
- [3] S. Luchetti, I. Huitinga, D.F. Swaab, Neurosteroid and GABA-A receptor alterations in Alzheimer's disease, Parkinson's disease and multiple sclerosis, *Neuroscience* 191 (2011) 6–21.
- [4] S. Liu, H. Wu, G. Xue, X. Ma, J. Wu, Y. Qin, Y. Hou, Metabolic alteration of neuroactive steroids and protective effect of progesterone in Alzheimer's disease-like rats, *Neural Regen. Res.* 8 (2013) 2800–2810.
- [5] J.M. Winkler, H.S. Fox, Transcriptome meta-analysis reveals a central role for sex steroids in the degeneration of hippocampal neurons in Alzheimer's disease, *BMC Syst. Biol.* 7 (2013) 51.
- [6] M. Napolitano, L. Costa, R. Piacentini, C. Grassi, A. Lanzone, A. Gulino, 17 $\beta$ -estradiol protects cerebellar granule cells against beta-amyloid-induced toxicity via the apoptotic mitochondrial pathway, *Neurosci. Lett.* 561 (2014) 134–139.
- [7] Y. Qin, Z. Chen, X. Han, H. Wu, Y. Yu, J. Wu, S. Liu, Y. Hou, Progesterone attenuates Abeta-induced neuronal toxicity via JNK inactivation and progesterone receptor membrane component 1-dependent inhibition of mitochondrial apoptotic pathway, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 154 (2015) 302–311.
- [8] M. Schumacher, C. Mattern, A. Ghomari, J.P. Oudinet, P. Liere, F. Labombarda, R. Sitruk-Ware, A.F. De Nicola, R. Guennoun, Revisiting the roles of progesterone and allopregnanolone in the nervous system: resurgence of the progesterone receptors, *Prog. Neurobiol.* 113 (2014) 6–39.
- [9] R. Hampf, M. Bicikova, Neuroimmunomodulatory steroids in Alzheimer dementia, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 119 (2010) 97–104.
- [10] S.M. MacKenzie, D. Dewar, W. Stewart, R. Fraser, J.M. Connell, E. Davies, The transcription of steroidogenic genes in the human cerebellum and hippocampus: a comparative survey of normal and Alzheimer's tissue, *J. Endocrinol.* 196 (2008) 123–130.
- [11] R. Morfin, J. Young, C. Corpechot, B. Egestad, J. Sjovall, E.E. Baulieu, Neurosteroids: pregnenolone in human sciatic nerves, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89 (1992) 6790–6793.
- [12] E. de Peretti, E. Mappus, Pattern of plasma pregnenolone sulfate levels in humans from birth to adulthood, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 57 (1983) 550–556.
- [13] A. Lanthier, V.V. Patwardhan, Sex steroids and 5-en-3 beta-hydroxysteroids in specific regions of the human brain and cranial nerves, *J. Steroid Biochem.* 25 (1986) 445–449.
- [14] C. Lacroix, J. Fiet, J.P. Benais, B. Gueux, R. Bonete, J.M. Villette, B. Gourmel, C. Dreux, Simultaneous radioimmunoassay of progesterone, androst-4-enedione, pregnenolone, dehydroepiandrosterone and 17-hydroxyprogesterone in specific regions of human brain, *J. Steroid Biochem.* 28 (1987) 317–325.
- [15] S. Weill-Engerer, J.P. David, V. Szadovitch, P. Liere, B. Eychenne, A. Pianos, M. Schumacher, A. Delacourte, E.E. Baulieu, Y. Akwa, Neurosteroid quantification in human brain regions: comparison between Alzheimer's and nondemented patients, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87 (2002) 5138–5143.
- [16] H. Havlikova, M. Hill, R. Hampf, L. Starka, Sex- and age-related changes in epitestosterone in relation to pregnenolone sulfate and testosterone in normal subjects, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87 (2002) 2225–2231.
- [17] M. Hill, A. Paskova, R. Kanceva, M. Velikova, J. Kubatova, L. Kanceva, K. Adamcova, M. Mikesova, Z. Zizka, M. Koucky, H. Sarapatkova, V. Kacer, P. Matucha, M. Meloun, A. Parizek, Steroid profiling in pregnancy: a focus on the human fetus, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 139 (2014) 201–222.
- [18] H. Mickan, J. Zander, Pregnanolones, pregnenolone and progesterone in the human fetal tissues of early and midtrimester pregnancy, *J. Steroid Biochem.* 11 (1979) 1467–1470.
- [19] W.M. Pardridge, L.J. Mietus, Transport of steroid hormones through the rat blood–brain barrier. Primary role of albumin-bound hormone, *J. Clin. Invest.* 64 (1979) 145–154.
- [20] M. Bixo, T. Backstrom, B. Winblad, A. Andersson, Estradiol and testosterone in specific regions of the human female brain in different endocrine states, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 55 (1995) 297–303.
- [21] R. Kancheva, M. Hill, Z. Novak, J. Chrastina, M. Velikova, L. Kancheva, I. Riha, L. Starka, Peripheral neuroactive steroids may be as good as the steroids in the cerebrospinal fluid for the diagnostics of CNS disturbances, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 119 (2010) 35–44.
- [22] R. Kancheva, M. Hill, Z. Novak, J. Chrastina, L. Kancheva, L. Starka, Neuroactive steroids in periphery and cerebrospinal fluid, *Neuroscience* 191 (2011) 22–27.
- [23] E.R. Rosario, L. Chang, E.H. Head, F.Z. Stanczyk, C.J. Pike, Brain levels of sex steroid hormones in men and women during normal aging and in Alzheimer's disease, *Neurobiol. Aging* 32 (2011) 604–613.
- [24] W.A. Banks, Brain meets body: the blood–brain barrier as an endocrine interface, *Endocrinology* 153 (2012) 4111–4119.
- [25] M.P. van den Berg, J.C. Verhoef, S.G. Romeijn, F.W. Merkus, Uptake of estradiol or progesterone into the CSF following intranasal and intravenous delivery in rats, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 58 (2004) 131–135.
- [26] C.E. Wood, K.E. Gridley, M. Keller-Wood, Biological activity of 17 $\beta$ -estradiol-3-sulfate in ovine fetal plasma and uptake in fetal brain, *Endocrinology* 144 (2003) 599–604.
- [27] K. Hosoya, H. Asaba, T. Terasaki, Brain-to-blood efflux transport of estrone-3-sulfate at the blood–brain barrier in rats, *Life Sci.* 67 (2000) 2699–2711.
- [28] H. Asaba, K. Hosoya, H. Takanaga, S. Ohtsuki, E. Tamura, T. Takizawa, T. Terasaki, Blood–brain barrier is involved in the efflux transport of a neuroactive steroid, dehydroepiandrosterone sulfate, via organic anion transporting polypeptide 2, *J. Neurochem.* 75 (2000) 1907–1916.
- [29] L. Kriz, M. Bicikova, M. Hill, R. Hampf, Steroid sulfatase and sulfuryl transferase activity in monkey brain tissue, *Steroids* 70 (2005) 960–969.
- [30] W.M. van Weerden, H.G. Bierings, G.J. van Steenbrugge, F.H. de Jong, F.H. Schroder, Adrenal glands of mouse and rat do not synthesize androgens, *Life Sci.* 50 (1992) 857–861.
- [31] BioGPS, 2015, Affymetrix.
- [32] A.J. Conley, Bird, The role of cytochrome P450 17 alpha-hydroxylase and 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in the integration of gonadal and adrenal steroidogenesis via the delta 5 and delta 4 pathways of steroidogenesis in mammals, *Biol. Reprod.* 56 (1997) 789–799.
- [33] J.D. Wilson, R.J. Auchus, M.W. Leihy, O.L. Guryev, R.W. Estabrook, S.M. Osborn, G. Shaw, M.B. Renfree, 5alpha-androstane-3alpha,17beta-diol is formed in tammar wallaby pouch young testes by a pathway involving 5alpha-pregnane-3alpha,17alpha-diol-20-one as a key intermediate, *Endocrinology* 144 (2003) 575–580.
- [34] M. Mahendroo, J.D. Wilson, J.A. Richardson, R.J. Auchus, Steroid 5alpha-reductase 1 promotes 5alpha-androstane-3alpha,17beta-diol synthesis in immature mouse testes by two pathways, *Mol. Cell Endocrinol.* 222 (2004) 113–120.
- [35] K. Homma, T. Hasegawa, T. Nagai, M. Adachi, R. Horikawa, I. Fujiwara, T. Tajima, R. Takeda, M. Fukami, T. Ogata, Urine steroid hormone profile analysis in cytochrome P450 oxidoreductase deficiency: implication for the backdoor pathway to dihydrotestosterone, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 91 (2006) 2643–2649.
- [36] K. Kamrath, M.F. Hartmann, S.A. Wudy, Androgen synthesis in patients with congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency, *Horm. Metab. Res.* 45 (2013) 86–91.
- [37] D.H. Abbott, I.M. Bird, Nonhuman primates as models for human adrenal androgen production: function and dysfunction, *Rev. Endocr. Metab. Disord.* 10 (2009) 33–42.
- [38] J.K. Blevins, J.E. Coxworth, J.G. Herndon, K. Hawkes, Brief communication: adrenal androgens and aging: Female chimpanzees (*Pan troglodytes*) compared with women, *Am. J. Phys. Anthropol.* 151 (2013) 643–648.
- [39] C.R. Overk, S.E. Perez, C. Ma, M.D. Taves, K.K. Soma, E.J. Mufson, Sex steroid levels and AD-like pathology in 3xTgAD mice, *J. Neuroendocrinol.* 25 (2013) 131–144.
- [40] M. Hill, A. Parizek, R. Kancheva, M. Duskova, M. Velikova, L. Kriz, M. Klimkova, A. Paskova, Z. Zizka, P. Matucha, M. Meloun, L. Starka, Steroid metabolome in plasma from the umbilical artery, umbilical vein, maternal cubital vein and in amniotic fluid in normal and preterm labor, *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 121 (2010) 594–610.
- [41] M. Hill, J. Zarubova, P. Marusic, J. Vrbikova, M. Velikova, R. Kancheva, L. Kancheva, J. Kubatova, M. Duskova, L. Zamrazilova, H. Kazihnikova, K. Simunkova, L. Starka, Effects of valproate and carbamazepine monotherapy on neuroactive steroids, their precursors and metabolites in adult men with epilepsy, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 122 (2010) 239–252.
- [42] M. Hill, J. Vrbikova, J. Zarubova, R. Kancheva, M. Velikova, L. Kancheva, J. Kubatova, M. Duskova, P. Marusic, A. Parizek, L. Starka, The steroid metabolome in lamotrigine-treated women with epilepsy, *Steroids* 76 (2011) 1351–1357.
- [43] L. Dehennin, G. Peres, Plasma and urinary markers of oral testosterone misuse by healthy men in presence of masking epitestosterone administration, *Int. J. Sports Med.* 17 (1996) 315–319.
- [44] M. Hill, R. Hampf, D. Lukac, O. Lapcik, V. Pouzar, J. Sulcova, Elimination of cross-reactivity by addition of an excess of cross-reactant for radioimmunoassay of 17alpha-hydroxypregnenolone, *Steroids* 64 (1999) 341–355.

- [45] M. Brochu, A. Belanger, Comparative study of plasma steroid and steroid glucuronide levels in normal men and in men with benign prostatic hyperplasia, *Prostate* 11 (1987) 33–40.
- [46] A. Sanchez-Guijo, V. Oji, M.F. Hartmann, H. Traupe, S.A. Wudy, Simultaneous quantification of cholesterol sulfate, androgen sulfates, and progestagen sulfates in human serum by LC–MS/MS, *J. Lipid Res.* 56 (2015) 1843–1851.
- [47] F. Labrie, A. Belanger, L. Cusan, J.L. Gomez, B. Candau, Marked decline in serum concentrations of adrenal C19 sex steroid precursors and conjugated androgen metabolites during aging, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82 (1997) 2396–2402.
- [48] M. Brochu, A. Belanger, A. Dupont, L. Cusan, F. Labrie, Effects of flutamide and aminoglutethimide on plasma 5 alpha-reduced steroid glucuronide concentrations in castrated patients with cancer of the prostate, *J. Steroid Biochem.* 28 (1987) 619–622.
- [49] K. Tokushige, E. Hashimoto, K. Kodama, M. Tobar, N. Matsushita, T. Kogiso, M. Tani, N. Torii, K. Shiratori, Y. Nishizaki, T. Ohga, Y. Ohashi, T. Sato, Serum metabolomic profile and potential biomarkers for severity of fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease, *J. Gastroenterol.* 48 (2013) 1392–1400.
- [50] L.J. Meng, H. Reyes, M. Axelson, J. Palma, I. Hernandez, J. Ribalta, J. Sjoval, Progesterone metabolites and bile acids in serum of patients with intrahepatic cholestasis of pregnancy: effect of ursodeoxycholic acid therapy, *Hepatology* 26 (1997) 1573–1579.
- [51] S. Abu-Hayyeh, G. Papacleovoulou, A. Lovgren-Sandblom, M. Tahir, O. Oduwole, N.A. Jamaludin, S. Ravat, V. Nikolova, J. Chambers, C. Selden, M. Rees, H.U. Marschall, M.G. Parker, C. Williamson, Intrahepatic cholestasis of pregnancy levels of sulfated progesterone metabolites inhibit farnesoid X receptor resulting in a cholestatic phenotype, *Hepatology* 57 (2013) 716–726.
- [52] C.A. Strott, Sulfonation and molecular action, *Endocr. Rev.* 23 (2002) 703–732.
- [53] T. Yanase, M. Fukahori, S. Taniguchi, Y. Nishi, Y. Sakai, R. Takayanagi, M. Haji, H. Nawata, Serum dehydroepiandrosterone (DHEA) and DHEA-sulfate (DHEA-S) in Alzheimer's disease and in cerebrovascular dementia, *Endocr. J.* 43 (1996) 119–123.
- [54] S.B. Kim, M. Hill, Y.T. Kwak, R. Hampl, D.H. Jo, R. Morfin, R.J. Neurosteroids, Cerebrospinal fluid levels for Alzheimer's disease and vascular dementia diagnostics, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 88 (2003) 5199–5206.
- [55] W.L. Miller, R.J. Auchus, The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders, *Endocr. Rev.* 32 (2011) 81–151.
- [56] J. Rege, W.E. Rainey, The steroid metabolome of adrenarche, *J. Endocrinol.* 214 (2012) 133–143.
- [57] Y.V. Louwers, F.H. de Jong, N.A. van Herwaarden, L. Stolk, B.C. Fauser, A.G. Uitterlinden, J.S. Laven, Variants in SULT2A1 affect the DHEA sulphate to DHEA ratio in patients with polycystic ovary syndrome but not the hyperandrogenic phenotype, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 98 (2013) 3848–3855.
- [58] J. Schulze, M. Johansson, J.O. Thorgren, M. Garle, A. Rane, L. Ekstrom, SULT2A1 gene copy number variation is associated with urinary excretion rate of steroid sulfates, *Front. Endocrinol. (Lausanne)* 4 (88) (2013) .
- [59] D. Tamae, M. Byrns, B. Marck, E.A. Mostaghel, P.S. Nelson, P. Lange, D. Lin, M.E. Taplin, S. Balk, W. Ellis, L. True, R. Vessella, B. Montgomery, I.A. Blair, T.M. Penning, Development, validation and application of a stable isotope dilution liquid chromatography electrospray ionization/selected reaction monitoring/mass spectrometry (SID-LC/ESI/MS) method for quantification of keto-androgens in human serum, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 138C (2013) 281–289.
- [60] T.L. Rizner, T.M. Penning, Role of aldo-keto reductase family 1 (AKR1) enzymes in human steroid metabolism, *Steroids* 79 (2014) 49–63.
- [61] A. Parizek, M. Hill, R. Kancheva, H. Havlikova, L. Kancheva, J. Cindr, A. Paskova, V. Pouzar, I. Cerny, P. Drbohlav, Z. Hajek, L. Starka, Neuroactive pregnanolone isomers during pregnancy, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 90 (2005) 395–403.
- [62] J.G. Lewis, P.M. George, P.A. Elder, Plasma androstosterone/epiandrosterone sulfates as markers of 5 alpha-reductase activity: effect of finasteride in normal men, *Steroids* 62 (1997) 632–635.
- [63] T. Sun, W.K. Oh, S. Jacobus, M. Regan, M. Pomerantz, M.L. Freedman, G.S. Lee, P.W. Kantoff, The impact of common genetic variations in genes of the sex hormone metabolic pathways on steroid hormone levels and prostate cancer aggressiveness, *Cancer Prev. Res. (Phila.)* 4 (2011) 2044–2050.
- [64] L. El Kihel, Oxidative metabolism of dehydroepiandrosterone (DHEA) and biologically active oxygenated metabolites of DHEA and epiandrosterone (EpiA)—recent reports, *Steroids* 77 (2012) 10–26.
- [65] E. Lerchbaum, V. Schwetz, T. Rabe, A. Giuliani, B. Obermayer-Pietsch, Hyperandrogenemia in polycystic ovary syndrome: exploration of the role of free testosterone and androstenedione in metabolic phenotype, *PLoS One* 9 (2014) e108263.
- [66] S.F. Ahmed, J.C. Achermann, W. Arlt, A. Balen, G. Conway, Z. Edwards, S. Elford, I.A. Hughes, L. Izatt, N. Krone, H. Miles, S. O'Toole, L. Perry, C. Sanders, M. Simmonds, A. Watt, D. Willis, Society for Endocrinology UK guidance on the initial evaluation of an infant or an adolescent with a suspected disorder of sex development (Revised 2015), *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* (2015) .
- [67] O. Hennebert, S. Chalbot, S. Alran, R. Morfin, Dehydroepiandrosterone 7alpha-hydroxylation in human tissues: possible interference with type 1 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase-mediated processes, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 104 (2007) 326–333.
- [68] B. Kim, J.Y. Moon, M.H. Choi, H.H. Yang, S. Lee, K.S. Lim, S.H. Yoon, K.S. Yu, I.J. Jang, J.Y. Cho, Global metabolomics and targeted steroid profiling reveal that rifampin, a strong human PXR activator, alters endogenous urinary steroid markers, *J. Proteome Res.* 12 (2013) 1359–1368.
- [69] H. Ueshiba, Y. Shimizu, N. Hiroi, F. Yakushiji, M. Shimojo, K. Tsuboi, Y. Miyachi, Decreased steroidogenic enzyme 17,20-lyase and increased 17-hydroxylase activities in type 2 diabetes mellitus, *Eur. J. Endocrinol.* 146 (2002) 375–380.
- [70] M. Hill, A. Parizek, J. Klak, R. Hampl, J. Sulcova, H. Havlikova, O. Lapcik, M. Bicikova, T. Fait, R. Kancheva, D. Cibula, V. Pouzar, M. Meloun, L. Starka, Neuroactive steroids, their precursors and polar conjugates during parturition and postpartum in maternal and umbilical blood: 3.3beta-hydroxy-5-ene steroids, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 82 (2002) 241–250.
- [71] C. Moran, R. Reyna, L.S. Boots, R. Azziz, Adrenocortical hyperresponsiveness to corticotropin in polycystic ovary syndrome patients with adrenal androgen excess, *Fertil. Steril.* 81 (2004) 126–131.
- [72] T. Naessen, U. Sjogren, J. Bergquist, M. Larsson, L. Lind, M.M. Kushnir, Endogenous steroids measured by high-specificity liquid chromatography-tandem mass spectrometry and prevalent cardiovascular disease in 70-year-old men and women, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 95 (2010) 1889–1897.
- [73] V. Luu-The, Assessment of steroidogenesis and steroidogenic enzyme functions, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 137 (2013) 176–182.
- [74] F. Gonzalez, L. Chang, T. Horab, F.Z. Stanczyk, K. Crickard, R.A. Lobo, Adrenal dynamic responses to physiologic and pharmacologic adrenocorticotrophic hormone stimulation before and after ovarian steroid modulation in women with polycystic ovary syndrome, *Fertil. Steril.* 71 (1999) 439–444.
- [75] T. Kosaka, A. Miyajima, Y. Yasumizu, Y. Miyazaki, E. Kikuchi, M. Oya, Limited in vitro efficacy of CYP17A1 inhibition on human castration resistant prostate cancer, *Steroids* 92 (2014) 39–44.
- [76] J. Neunzig, A. Sanchez-Guijo, A. Mosa, M.F. Hartmann, J. Geyer, S.A. Wudy, R. Bernhardt, A steroidogenic pathway for sulfonated steroids: the metabolism of pregnenolone sulfate, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 144 (Pt B) (2014) 324–333.
- [77] M.P. Caulfield, T. Lynn, M.E. Gottschalk, K.L. Jones, N.F. Taylor, E.M. Malunowicz, C.H. Shackleton, R.E. Reitz, D.A. Fisher, The diagnosis of congenital adrenal hyperplasia in the newborn by gas chromatography/mass spectrometry analysis of random urine specimens, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87 (2002) 3682–3690.
- [78] J. Vrbikova, M. Hill, L. Starka, D. Cibula, B. Bendlova, K. Vondra, J. Sulcova, M. Snajderova, The effects of long-term metformin treatment on adrenal and ovarian steroidogenesis in women with polycystic ovary syndrome, *Eur. J. Endocrinol.* 144 (2001) 619–628.
- [79] S. Pang, G. Carbanaru, A. Haider, K.C. Copeland, Y.T. Chang, C. Lutfallah, J.I. Mason, Carriers for type II 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase (HSD3B2) deficiency can only be identified by HSD3B2 genotype study and not by hormone test, *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* 58 (2003) 323–331.
- [80] G. Carbanaru, P. Prasad, B. Scoccia, P. Shea, N. Hopwood, F. Ziai, Y.T. Chang, S.E. Myers, J.I. Mason, S. Pang, The hormonal phenotype of Nonclassic 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase (HSD3B) deficiency in hyperandrogenic females is associated with insulin-resistant polycystic ovary syndrome and is not a variant of inherited HSD3B2 deficiency, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89 (2004) 783–794.
- [81] S.F. Medeiros, A.B. Gil-Junior, J.S. Barbosa, E.D. Isaias, M.M. Yamamoto, New insights into steroidogenesis in normo- and hyperandrogenic polycystic ovary syndrome patients, *Arch. Bras. Endocrinol. Metabol.* 57 (2013) 437–444.
- [82] R.L. Rosenfield, A. Barmach de Niepomnisszce, F.M. Kenny, M. Genel, The response to human chorionic gonadotropin (HCG) administration in boys with and without delta5-3beta-hydroxysteroid dehydrogenase deficiency, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 39 (1974) 370–374.
- [83] B. Byrne, S. Cunningham, D. Igoe, R. Conroy, T.J. McKenna, Sex steroids: adiposity and smoking in the pathogenesis of idiopathic hirsutism and polycystic ovary syndrome, *Acta Endocrinol. (Copenh.)* 124 (1991) 370–374.
- [84] F. Baghaei, R. Rosmond, L. Westberg, M. Hellstrand, E. Eriksson, G. Holm, P. Bjornorp, The CYP19 gene and associations with androgens and abdominal obesity in premenopausal women, *Obes. Res.* 11 (2003) 578–585.
- [85] A.M. Dunning, M. Dowsett, C.S. Healey, L. Tee, R.N. Luben, E. Folkard, K.L. Novik, L. Kelemen, S. Ogata, P.D. Pharoah, D.F. Easton, N.E. Day, B.A. Ponder, Polymorphisms associated with circulating sex hormone levels in postmenopausal women, *J. Natl. Cancer Inst.* 96 (2004) 936–945.
- [86] P. Van Renterghem, P. Van Eenoo, H. Geyer, W. Schanzer, F.T. Delbeke, Reference ranges for urinary concentrations and ratios of endogenous steroids which can be used as markers for steroid misuse, in a Caucasian population of athletes, *Steroids* 75 (2010) 154–163.
- [87] S. Kanda, N. Tsuchiya, S. Narita, T. Inoue, M. Huang, S. Chiba, S. Akihama, M. Saito, K. Numakura, H. Tsuruta, S. Satoh, S. Saito, C. Ohyama, Y. Arai, O. Ogawa, T. Habuchi, Effects of functional genetic polymorphisms in the CYP19A1 gene on prostate cancer risk and survival, *Int. J. Cancer* 136 (2015) 74–82.
- [88] M.W. Huysman, A.C. Hokken-Koelega, M.A. De Ridder, P.J. Sauer, Adrenal function in sick very preterm infants, *Pediatr. Res.* 48 (2000) 629–633.
- [89] R.H. Straub, L. Paimela, R. Peltomaa, J. Scholmerich, M. Leirisalo-Repo, Inadequately low serum levels of steroid hormones in relation to interleukin-6 and tumor necrosis factor in untreated patients with early rheumatoid arthritis and reactive arthritis, *Arthritis Rheum.* 46 (2002) 654–662.
- [90] R.H. Straub, A. Schulz, J. Mullington, M. Haack, J. Scholmerich, T. Pollmacher, The endotoxin-induced increase of cytokines is followed by an increase of cortisol relative to dehydroepiandrosterone (DHEA) in healthy male subjects, *J. Endocrinol.* 175 (2002) 467–474.
- [91] H.P. Sondergaard, M.M. Kushnir, B. Aronsson, P. Sandstedt, J. Bergquist, Patterns of endogenous steroids in apathetic refugee children are compatible with long-term stress, *BMC Res. Notes* 5 (2012) 186.

- [92] K.H. Shin, M.H. Choi, K.S. Lim, K.S. Yu, I.J. Jang, J.Y. Cho, Evaluation of endogenous metabolic markers of hepatic CYP3A activity using metabolic profiling and metazolam clearance, *Clin. Pharmacol. Ther.* 94 (2013) 601–609.
- [93] S.H. Lee, S.Y. Nam, B.C. Chung, Altered profile of endogenous steroids in the urine of patients with prolactinoma, *Clin. Biochem.* 31 (1998) 529–535.
- [94] M. Chen, J.E. Drury, T.M. Penning, Substrate specificity and inhibitor analyses of human steroid 5beta-reductase (AKR1D1), *Steroids* 76 (2011) 484–490.
- [95] M. Chen, T.M. Penning, 5beta-Reduced steroids and human Delta(4)-3-ketosteroid 5beta-reductase (AKR1D1), *Steroids* 83 (2014) 17–26.
- [96] H. Pettersson, L. Holmberg, M. Axelson, M. Norlin, CYP7B1-mediated metabolism of dehydroepiandrosterone and 5alpha-androstane-3beta,17beta-diol—potential role(s) for estrogen signaling, *FEBS J.* 275 (2008) 1778–1789.
- [97] H. Pettersson, J. Lundqvist, M. Norlin, Effects of CYP7B1-mediated catalysis on estrogen receptor activation, *Biochim. Biophys. Acta* 1801 (2010) 1090–1097.
- [98] C.N. Ahlem, T.M. Page, D.L. Auci, M.R. Kennedy, K. Mangano, F. Nicoletti, Y. Ge, Y. Huang, S.K. White, S. Villegas, D. Conrad, A. Wang, C.L. Reading, J.M. Frincke, Novel components of the human metabolome: the identification, characterization and anti-inflammatory activity of two 5-androstene tetrols, *Steroids* 76 (2011) 145–155.
- [99] M. Meloun, M. Hill, J. Miličty, K. Kupka, Transformation in the PC-aided biochemical data analysis, *Clin. Chem. Lab. Med.* 38 (2000) 553–559.
- [100] M. Meloun, M. Hill, J. Miličty, J. Vrbikova, S. Stanicka, J. Skrha, New methodology of influential point detection in regression model building for the prediction of metabolic clearance rate of glucose, *Clin. Chem. Lab. Med.* 42 (2004) 311–322.
- [101] M. Meloun, J. Miličty, M. Hill, R.G. Brereton, Crucial problems in regression modelling and their solutions, *Analyst* 127 (2002) 433–450.
- [102] H.F. Escobar-Morreale, M. Asuncion, R.M. Calvo, J. Sancho, J.L. San Millan, Receiver operating characteristic analysis of the performance of basal serum hormone profiles for the diagnosis of polycystic ovary syndrome in epidemiological studies, *Eur. J. Endocrinol.* 145 (2001) 619–624.
- [103] C. Czech, P. Berndt, K. Busch, O. Schmitz, J. Wiemer, V. Most, H. Hampel, J. Kastler, H. Senn, Metabolite profiling of Alzheimer's disease cerebrospinal fluid, *PLoS One* 7 (2012) e31501.
- [104] T.M. Kerkhofs, M.N. Kerstens, I.P. Kema, T.P. Willems, H.R. Haak, Diagnostic value of urinary steroid profiling in the evaluation of adrenal tumors, *Horm. Cancer* 6 (2015) 168–175.
- [105] W.J. Youden, Index for rating diagnostic tests, *Cancer* 3 (1950) 32–35.
- [106] J. Trygg, E. Holmes, T. Lundstedt, Chemometrics in metabolomics, *J. Proteome Res.* 6 (2007) 469–479.
- [107] J. Trygg, S. Wold, Orthogonal projections to latent structure, *J. Chemometrics* 16 (2002) 119–128.
- [108] R. Madsen, T. Lundstedt, J. Trygg, Chemometrics in metabolomics—a review in human disease diagnosis, *Anal. Chim. Acta* 659 (2010) 23–33.
- [109] J. Rege, Y. Nakamura, T. Wang, T.D. Merchen, H. Sasano, W.E. Rainey, Transcriptome profiling reveals differentially expressed transcripts between the human adrenal zona fasciculata and zona reticularis, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 99 (2014) E518–E527.
- [110] S. Dharia, A. Slane, M. Jian, M. Conner, A.J. Conley, R.M. Brissie, C.R. Parker Jr., Effects of aging on cytochrome b5 expression in the human adrenal gland, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 90 (2005) 4357–4361.
- [111] F. Bernardi, A. Lanzone, R.M. Cento, R.S. Spada, I. Pezzani, A.D. Genazzani, S. Luisi, M. Luisi, F. Petraglia, A.R. Genazzani, Allopregnanolone and dehydroepiandrosterone response to corticotropin-releasing factor in patients suffering from Alzheimer's disease and vascular dementia, *Eur. J. Endocrinol.* 142 (2000) 466–471.
- [112] J. Olazaran, L. Gil-de-Gomez, A. Rodriguez-Martin, M. Valenti-Soler, B. Frades-Payo, J. Marin-Munoz, C. Antunez, A. Frank-Garcia, C. Acedo-Jimenez, L. Morlan-Gracia, R. Petidier-Torregrossa, M.C. Guisasaola, F. Bermejo-Pareja, A. Sanchez-Ferro, D.A. Perez-Martinez, S. Manzano-Palomo, R. Farquhar, A. Rabano, M. Calero, A blood-based: 7-metabolite signature for the early diagnosis of Alzheimer's disease, *J. Alzheimers Dis.* 45 (2015) 1157–1173.
- [113] Y. Nakamura, H.X. Gang, T. Suzuki, H. Sasano, W.E. Rainey, Adrenal changes associated with adrenarche, *Rev. Endocr. Metab. Disord.* 10 (2009) 19–26.
- [114] Y. Xing, K. Saner-Amigh, Y. Nakamura, M.M. Hinshelwood, B.R. Carr, J.J. Mason, W.E. Rainey, The farnesoid X receptor regulates transcription of 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in human adrenal cells, *Mol. Cell. Endocrinol.* 299 (2009) 153–162.
- [115] B. Nasman, T. Olsson, T. Backstrom, S. Eriksson, K. Grankvist, M. Viitanen, G. Bucht, Serum dehydroepiandrosterone sulfate in Alzheimer's disease and in multi-infarct dementia, *Biol. Psychiatry* 30 (1991) 684–690.
- [116] T. Hillen, A. Lun, F.M. Reischies, M. Borchelt, E. Steinhagen-Thiessen, R.T. Schaub, DHEA-S plasma levels and incidence of Alzheimer's disease, *Biol. Psychiatry* 47 (2000) 161–163.
- [117] S. Aldred, P. Mecocci, Decreased dehydroepiandrosterone (DHEA) and dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) concentrations in plasma of Alzheimer's disease (AD) patients, *Arch. Gerontol. Geriatr.* 51 (2010) e16–e18.
- [118] M. Park-Chung, A. Malayev, R.H. Purdy, T.T. Gibbs, D.H. Farb, Sulfated and unsulfated steroids modulate gamma-aminobutyric acidA receptor function through distinct sites, *Brain Res.* 830 (1999) 72–87.
- [119] C. Muller, D. Pompon, R. Urban, R. Morfin, Inter-conversion of 7alpha- and 7beta-hydroxy-dehydroepiandrosterone by the human 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 99 (2006) 215–222.
- [120] O. Hennebert, M.A. Pelissier, S. Le Mee, E. Wulfert, R. Morfin, Anti-inflammatory effects and changes in prostaglandin patterns induced by 7beta-hydroxy-epiandrosterone in rats with colitis, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 110 (2008) 255–262.
- [121] S. Le Mee, O. Hennebert, C. Ferrec, E. Wulfert, R. Morfin, 7beta-Hydroxy-epiandrosterone-mediated regulation of the prostaglandin synthesis pathway in human peripheral blood monocytes, *Steroids* 73 (2008) 1148–1159.
- [122] D.L. Auci, C.L. Reading, J.M. Frincke, 7-Hydroxy androstene steroids and a novel synthetic analogue with reduced side effects as a potential agent to treat autoimmune diseases, *Autoimmun. Rev.* 8 (2009) 369–372.
- [123] L.E. Carlson, B.B. Sherwin, H.M. Chertkow, Relationships between dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) and cortisol (CRT) plasma levels and everyday memory in Alzheimer's disease patients compared to healthy controls, *Horm. Behav.* 35 (1999) 254–263.
- [124] O.M. Wolkowitz, J.H. Kramer, V.I. Reus, M.M. Costa, K. Yaffe, P. Walton, M. Raskind, E. Peskind, P. Newhouse, D. Sack, E. De Souza, C. Sadowsky, E. Roberts, DHEA treatment of Alzheimer's disease: a randomized, double-blind, placebo-controlled study, *Neurology* 60 (2003) 1071–1076.
- [125] R.C. Brown, Z. Han, C. Cascio, V. Papadopoulos, Oxidative stress-mediated DHEA formation in Alzheimer's disease pathology, *Neurobiol. Aging* 24 (2003) 57–65.
- [126] M. Petrovic, M. Sedlacek, O. Cais, M. Horak, H. Chodounska, L. Vyklicky Jr., Pregnenolone sulfate modulation of N-methyl-D-aspartate receptors is phosphorylation dependent, *Neuroscience* 160 (2009) 616–628.
- [127] H. Shirakawa, H. Katsuki, T. Kume, S. Kaneko, A. Akaike, Pregnenolone sulphate attenuates AMPA cytotoxicity on rat cortical neurons, *Eur. J. Neurosci.* 21 (2005) 2329–2335.
- [128] M.A. Rogawski, AMPA receptors as a molecular target in epilepsy therapy, *Acta Neurol. Scand. Suppl.* (2013) 9–18.
- [129] P.K. Chang, D. Verbich, R.A. McKinney, AMPA receptors as drug targets in neurological disease—advantages, caveats, and future outlook, *Eur. J. Neurosci.* 35 (2012) 1908–1916.
- [130] C.J. Cunningham, M. Sinnott, A. Denihan, M. Rowan, J.B. Walsh, R. O'Moore, D. Coakley, R.F. Coen, B.A. Lawler, D.D. O'Neill, Endogenous sex hormone levels in postmenopausal women with Alzheimer's disease, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86 (2001) 1099–1103.
- [131] S. Rasmuson, B. Nasman, S. Eriksson, K. Carlstrom, T. Olsson, Adrenal responsivity in normal aging and mild to moderate Alzheimer's disease, *Biol. Psychiatry* 43 (1998) 401–407.
- [132] R.C. Melcangi, S. Giatti, D. Calabrese, M. Pesaresi, G. Cermenati, N. Mitro, B. Viviani, L.M. Garcia-Segura, D. Caruso, Levels and actions of progesterone and its metabolites in the nervous system during physiological and pathological conditions, *Prog. Neurobiol.* 113 (2014) 56–69.
- [133] H. Havlikova, M. Hill, L. Kancheva, J. Vrbikova, V. Pouzar, I. Cerny, R. Kancheva, L. Starka, Serum profiles of free and conjugated neuroactive pregnanolone isomers in nonpregnant women of fertile age, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 91 (2006) 3092–3099.
- [134] M. Sedlacek, M. Korinek, M. Petrovic, O. Cais, E. Adamusova, H. Chodounska, L. Vyklicky Jr., Neurosteroid modulation of ionotropic glutamate receptors and excitatory synaptic transmission, *Physiol. Res.* 57 (Suppl. 3) (2008) S49–S57.
- [135] T. Horishita, N. Yanagihara, S. Ueno, Y. Sudo, Y. Uezono, D. Okura, T. Minami, T. Kawasaki, T. Sata, Neurosteroids allopregnanolone sulfate and pregnanolone sulfate have diverse effect on the alpha subunit of the neuronal voltage-gated sodium channels Nav1.2, Nav1.6, Nav1.7, and Nav1.8 expressed in xenopus oocytes, *Anesthesiology* 121 (2014) 620–631.
- [136] S. Chen, J.M. Wang, R.W. Irwin, J. Yao, L. Liu, R.D. Brinton, Allopregnanolone promotes regeneration and reduces beta-amyloid burden in a preclinical model of Alzheimer's disease, *PLoS One* 6 (2011) e24293.
- [137] J.M. Wang, C. Singh, L. Liu, R.W. Irwin, S. Chen, E.J. Chung, R.F. Thompson, R.D. Brinton, Allopregnanolone reverses neurogenic and cognitive deficits in mouse model of Alzheimer's disease, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107 (2010) 6498–6503.
- [138] A.M. Barron, C.J. Pike, Sex hormones, aging, and Alzheimer's disease, *Front. Biosci. (Elite Ed.)* 4 (2012) 976–997.
- [139] L. Zhao, J. Yao, Z. Mao, S. Chen, Y. Wang, R.D. Brinton, 17beta-Estradiol regulates insulin-degrading enzyme expression via an ERbeta/PI3-K pathway in hippocampus: relevance to Alzheimer's prevention, *Neurobiol. Aging* 32 (2011) 1949–1963.
- [140] R.D. Brinton, Estrogen regulation of glucose metabolism and mitochondrial function: therapeutic implications for prevention of Alzheimer's disease, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 60 (2008) 1504–1511.
- [141] J.C. Carroll, E.R. Rosario, L. Chang, F.Z. Stanczyk, S. Oddo, F.M. LaFerla, C.J. Pike, Progesterone and estrogen regulate Alzheimer-like neuropathology in female 3xTg-AD mice, *J. Neurosci.* 27 (2007) 13357–13365.
- [142] J.E. Rossouw, G.L. Anderson, R.L. Prentice, A.Z. LaCroix, C. Kooperberg, M.L. Stefanick, R.D. Jackson, S.A. Beresford, B.V. Howard, K.C. Johnson, J.M. Kotchen, J. Ockene, Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results from the Women's Health Initiative randomized controlled trial, *JAMA* 288 (2002) 321–333.
- [143] S. Capellino, R.H. Straub, M. Cutolo, Aromatase and regulation of the estrogen-to-androgen ratio in synovial tissue inflammation: common pathway in both sexes, *Ann. NY Acad. Sci.* 1317 (2014) 24–31.
- [144] F. Sardi, L. Fassina, L. Venturini, M. Inguscio, F. Guerriero, E. Rolfo, G. Ricevuti, Alzheimer's disease, autoimmunity and inflammation. The good, the bad and the ugly, *Autoimmun. Rev.* 11 (2011) 149–153.

- [145] A. Malayev, T.T. Gibbs, D.H. Farb, Inhibition of the NMDA response by pregnenolone sulphate reveals subtype selective modulation of NMDA receptors by sulphated steroids, *Br. J. Pharmacol.* 135 (2002) 901–909.
- [146] M. Park-Chung, F.S. Wu, R.H. Purdy, A.A. Malayev, T.T. Gibbs, D.H. Farb, Distinct sites for inverse modulation of *N*-methyl-D-aspartate receptors by sulfated steroids, *Mol. Pharmacol.* 52 (1997) 1113–1123.
- [147] V. Vyklicky, B. Krausova, J. Cerny, A. Balik, M. Zapotocky, M. Novotny, K. Lichnerova, T. Smejkalova, M. Kaniakova, M. Korinek, M. Petrovic, P. Kacer, M. Horak, H. Chodounska, L. Vyklicky, Block of NMDA receptor channels by endogenous neurosteroids: implications for the agonist induced conformational states of the channel vestibule, *Sci. Rep.* 5 (2015) 10935.
- [148] T. Backstrom, M. Bixo, J. Stromberg, GABAA receptor-modulating steroids in relation to women's behavioral health, *Curr. Psychiatry Rep.* 17 (2015) 92.
- [149] M. Wang, Y. He, L.N. Eisenman, C. Fields, C.M. Zeng, J. Mathews, A. Benz, T. Fu, E. Zorumski, J.H. Steinbach, D.F. Covey, C.F. Zorumski, S. Mennerick, 3beta-hydroxypregnane steroids are pregnenolone sulfate-like GABA(A) receptor antagonists, *J. Neurosci.* 22 (2002) 3366–3375.
- [150] B.E. Murphy, F.V. Abbott, C.M. Allison, C. Watts, A.M. Ghadirian, Elevated levels of some neuroactive progesterone metabolites, particularly isopregnanolone, in women with chronic fatigue syndrome, *Psychoneuroendocrinology* 29 (2004) 245–268.
- [151] A. Drews, F. Mohr, O. Rizun, T.F. Wagner, S. Dembla, S. Rudolph, S. Lambert, M. Konrad, S.E. Philipp, M. Behrendt, S. Marchais-Oberwinkler, D.F. Covey, J. Oberwinkler, Structural requirements of steroidal agonists of transient receptor potential melastatin 3 (TRPM3) cation channels, *Br. J. Pharmacol.* 171 (2014) 1019–1032.
- [152] G. Thiel, I. Muller, O.G. Rossler, Signal transduction via TRPM3 channels in pancreatic beta-cells, *J. Mol. Endocrinol.* 50 (2013) R75–83.
- [153] M. Singh, C. Su, Progesterone and neuroprotection, *Horm. Behav.* 63 (2013) 284–290.
- [154] R.P. Irwin, S.Z. Lin, M.A. Rogawski, R.H. Purdy, S.M. Paul, Steroid potentiation and inhibition of *N*-methyl-D-aspartate receptor-mediated intracellular Ca<sup>++</sup> responses: structure-activity studies, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 271 (1994) 677–682.
- [155] W. Danysz, C.G. Parsons, Alzheimer's disease, beta-amyloid, glutamate, NMDA receptors and memantine—searching for the connections, *Br. J. Pharmacol.* 167 (2012) 324–352.
- [156] J.L. Yau, S. Rasmuson, R. Andrew, M. Graham, J. Noble, T. Olsson, E. Fuchs, R. Lathe, J.R. Seckl, Dehydroepiandrosterone 7-hydroxylase CYP7B: predominant expression in primate hippocampus and reduced expression in Alzheimer's disease, *Neuroscience* 121 (2003) 307–314.
- [157] Z. Zhou, C.H. Shackleton, S. Pahwa, P.C. White, P.W. Speiser, Prominent sex steroid metabolism in human lymphocytes, *Mol. Cell Endocrinol.* 138 (1998) 61–69.



## Reduced Sulfotransferase SULT2A1 Activity in Patients With Alzheimer's Disease

M. VAŇKOVÁ<sup>1</sup>, M. HILL<sup>1</sup>, M. VELÍKOVÁ<sup>1</sup>, J. VČELÁK<sup>1</sup>, G. VACÍNOVÁ<sup>1</sup>,  
P. LUKÁŠOVÁ<sup>1</sup>, D. VEJRAŽKOVÁ<sup>1</sup>, K. DVOŘÁKOVÁ<sup>1</sup>, R. RUSINA<sup>2,4</sup>, I. HOLMEROVÁ<sup>3</sup>,  
E. JAROLÍMOVÁ<sup>3</sup>, H. VAŇKOVÁ<sup>3,5</sup>, B. BENDLOVÁ<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Endocrinology, Prague, Czech Republic, <sup>2</sup>Thomayer Hospital, Prague, Czech Republic, <sup>3</sup>Faculty of Humanities, Charles University, Prague, Czech Republic, <sup>4</sup>Department of Neurology and Center of Clinical Neuroscience, Charles University in Prague, First Faculty of Medicine and General University Hospital in Prague, Czech Republic, <sup>5</sup>Third Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Czech Republic

Received August 2, 2015

Accepted August 18, 2015

### Summary

Steroids are important components in the pathophysiology of Alzheimer's disease (AD). Although their role has been studied, the corresponding metabolomic data is limited. In the present study we evaluate the role of steroid sulfotransferase SULT2A1 in the pathophysiology of AD on the basis of circulating steroids (measured by GC-MS), in which the sulfation catalyzed by SULT2A1 dominates over glucuronidation (pregnenolone/sulfate, DHEA/sulfate, androstenediol/sulfate and 5 $\alpha$ -reduced pregnane and androstane catabolites). To estimate a general trend of SULT2A1 activity in AD patients we compared the ratios of steroid conjugates to their unconjugated counterparts (C/U) in controls (11 men and 22 women) and AD patients (18 men and 16 women) for individual circulating steroids after adjustment for age and BMI using ANCOVA model including the factors AD status and gender. Decreased C/U ratio for the C19 steroids demonstrate an association between attenuated sulfation of C19 steroids in adrenal *zona reticularis* and the pathophysiology of AD.

### Key words

Alzheimer's disease • SULT2A1 • GC-MS • Steroids

### Corresponding author

M. Vaňková, Department of Molecular Endocrinology, Institute of Endocrinology, Národní 8, Prague, 116 94, Czech Republic.  
E-mail: mvankova@endo.cz

### Introduction

Alzheimer's disease (AD) represents more than one half of total dementias in seniors. The number of people living with dementia worldwide today is estimated at 44 million, set to almost double by 2030 and more than triple by 2050 (Prince *et al.* 2014).

AD is a neurodegenerative disease with progressive decline of episodic memory and impairment in other cognitive domains leading to dementia with loss of autonomy. Definite diagnosis of AD requires neuropathological confirmation from autopsy. Current diagnostic criteria for AD are mainly based on clinical and neuropsychological assessment (McKhann *et al.* 2011).

There is increasing evidence that pathological processes in the brain of AD patients may begin even 10-20 years before the first symptoms appear (Holtzman *et al.* 2011), therefore, the need for early diagnosis is important and other biomarkers may be useful.

Various factors including altered steroid biosynthesis may participate in the pathophysiology of AD. Steroid hormones are effective regulators of many physiological processes, including those in the brain (Hampel and Bickova 2010). Steroid hormones active in neural tissue are neuroactive steroids, which arise in the gonads (in women only in the reproductive period) and in the adrenal glands (the main source of postmenopausal women) and into the central nervous system are

transported across the blood-brain barrier directly or in the form of precursors. However, a small portion of steroids, called neurosteroids, are produced directly in nervous tissue. The peripheral steroidogenesis may substantially influence neuronal activity in the brain.

Age-related deficit of sex steroid hormones increases the risk of dysfunction in hormone-responsive tissues, including brain. Age-dependent hormone depletion in the brain may result in diminished neuroprotection, which increases a risk of neurodegenerative diseases such as AD (Rosario and Pike 2008). AD is more prevalent in women, which may be explained by differences in life expectancy in women compared to men. However, incidence of AD is also higher in women (Ruitenber *et al.* 2001). Nevertheless, the basis of higher vulnerability for females to AD remains unclear.

From the menopause, dehydroepiandrosterone (DHEA) remains the exclusive and adrenal tissue-specific source of sex steroids in women while in (65-75 year-old) men, the contribution of adrenal DHEA to the total androgens is approximately 40 % (Labrie 2010). Sex steroid hormones derived from DHEA show a similar decline from the age of 30 years in both genders, but there is a continuous supply of testosterone, estrone and estradiol from testes in men. The ovarian estradiol secretion in women ends at the menopause.

Age-related loss of sex steroid hormones is associated with numerous diseases such as tissue atrophy, bone loss, fat accumulation, type 2 diabetes mellitus, and also with cognition problems, memory loss and perhaps with AD (Labrie 2007). Alterations in steroid biosynthesis may contribute to the pathology of AD (Liu *et al.* 2013, Napolitano *et al.* 2014, Schumacher *et al.* 2014, Winkler and Fox 2013).

The endogenous sex steroids, estrogens, androgens, and progesterone, have effects on the brain, especially in perimenopausal and postmenopausal women (Yaffe *et al.* 2000). DHEA, which may be converted to estrogens locally in the brain, have been shown to enhance memory and learning functions (Vallee *et al.* 2001). Similarly, DHEA sulfate (DHEAS) influences brain function and affects memory capacity (Hunt *et al.* 2000). DHEA acting in the brain is either of peripheral origin, or may be synthesized directly in the brain and may be also converted into estrogens or androgens in brain tissues. Various brain areas express nuclear receptors for estrogens, androgens and progesterone. Besides the nuclear receptors, both androstane and

pregnane steroids may also modulate the permeability of various ion channels such as excitatory glutamate receptors on one hand or inhibitory gamma-aminobutyric acid (GABA) receptors on the other hand (Bergeron *et al.* 1996, Majewska *et al.* 1990, Hill *et al.* 2015, Starka *et al.* 2015).

Steroid sulfates having distinct physiological role compared with their unconjugated counterparts are important precursors of further bioactive steroids (Strott 2002). The circulating levels of conjugated steroids are usually much higher than in their non-conjugated forms. The steroid conjugates are frequently metabolic end-products with excellent water solubility enabling their uncomplicated excretion into the urine. The conjugation generally alters biological activity (Strott 1996) and may even convert the unconjugated steroids to their biological antagonists (Park-Chung *et al.* 1997, 1999). Even though the sulfotransferase activity in primate brain is low (Kriz *et al.* 2005), the sulfation of brain neurosteroids might participate on the maintenance of brain function. Steroid sulfates are bound to serum proteins such as albumin, corticosteroid binding globulin (CBG), and sex hormone binding globulin (SHBG), and serve as circulating reservoir, while non-conjugated forms are more active at the tissue level.

Human SULT2A1 (sulfotransferase family 2A, dehydroepiandrosterone-preferring, member 1) is enzyme strongly expressed in fetal zone of the fetal adrenal gland (Barker *et al.* 1994), and in the *zona reticularis* of the mature adrenal gland. Besides the primary source of steroid sulfotransferase activity in adrenal *zona reticularis*, also the kidneys and small intestine exhibit significant sulfotransferase activities (Barker *et al.* 1994, Otterness *et al.* 1992). SULT2A1 expression is also detectable in ovary and prostate, in stomach and colon (Javitt *et al.* 2001), but these tissues produce the enzyme at a lower levels (Shimada *et al.* 2001). Besides the DHEA, the SULT2A1 catalyzes the sulfation of further androgens, their 5 $\alpha$ / $\beta$ -reduced catabolites, pregnenolone, 5 $\alpha$ / $\beta$ -reduced pregnanolone isomers and pregnanediols, and also the bile acids. Whereas the lower ratio of circulating sulfates to unconjugated form of steroids may indicate the lower overall SULT2A1 activity, we attempted to investigate whether the reduced ratios of steroid sulfates to their unconjugated counterparts are consistently lower in the AD and if so, whether these ratios may be used as markers of AD.

## Materials and Methods

### Subjects

A total of 34 patients with AD (16 women and 18 men) fulfilling NINCDS-ADRDA criteria (National Institute of Neurological Communicative Disorders and Stroke – Alzheimer's disease and Related Disorders Association) for probable Alzheimer's disease and 33 controls of similar age as the patients (22 women and 11 men) participated in the study (Table 1).

Diagnosis of AD was confirmed by neuropsychological tests (Repeatable Battery for the Assessment of Neuropsychological Status, Montreal

Cognitive Assessment, and Geriatric Depression Scale), biochemical examination of cerebrospinal fluid ( $\beta$ -amyloid peptides, total and phosphorylated  $\tau$ -proteins) and magnetic resonance imaging of the brain. In our cohort of patients, 25 patients had AD, 3 patients had possible dementia with Lewy bodies in comorbidity and 6 patients had AD and significant subcortical ischemic white matter lesions consistent with the diagnosis of mixed dementia. Controls were examined with the same neuropsychological battery and had magnetic resonance imaging of the brain but lumbar puncture was not performed in these subjects.

**Table 1.** Comparison of anthropometric and biochemical characteristics in controls and in patients with Alzheimer's disease (AD).

Variable	Mean (95% confidence limits)		ANOVA <i>p</i>
	Controls	AD patients	
<b>Women</b>	<b>n = 22</b>	<b>n = 16</b>	
Age (years)	66.9 (65.1, 68.8)	74.8 (72.1, 77.7)	<b>0.001</b>
BMI ( $\text{kg}/\text{m}^2$ )	24.9 (23.6, 26.4)	27.7 (25.8, 29.8)	0.123
WHR	0.81 (0.79, 0.83)	0.84 (0.82, 0.87)	0.172
BAI	32.3 (30.7, 34.1)	31.7 (29.8, 33.7)	0.758
HbA1c (%)	39.3 (37.9, 40.7)	35.2 (33.4, 36.9)	<b>0.016</b>
Total cholesterol (mmol/l)	5.03 (4.77, 5.31)	5.55 (5.19, 5.97)	0.134
HDL-cholesterol (mmol/l)	1.53 (1.4, 1.66)	1.75 (1.58, 1.94)	0.179
LDL-cholesterol (mmol/l)	2.89 (2.6, 3.19)	3.25 (2.9, 3.63)	0.295
Triacylglycerols (mmol/l)	1.14 (1.01, 1.3)	1.08 (0.945, 1.26)	0.743
<b>Men</b>	<b>n = 11</b>	<b>n = 18</b>	
Age (years)	68.8 (64.5, 73.1)	72.5 (69.2, 75.8)	0.327
BMI ( $\text{kg}/\text{m}^2$ )	27.2 (25.7, 28.8)	26.1 (25, 27.2)	0.393
WHR	0.95 (0.92, 0.99)	0.93 (0.91, 0.96)	0.457
BAI	26.2 (25.1, 27.3)	26.3 (25.4, 27.2)	0.914
HbA1c (%)	38 (36.3, 39.6)	38.1 (36.8, 39.5)	0.904
Total cholesterol (mmol/l)	4.58 (4.13, 5.11)	4.55 (4.2, 4.95)	0.94
HDL-cholesterol (mmol/l)	1.42 (1.32, 1.52)	1.31 (1.23, 1.39)	0.24
LDL-cholesterol (mmol/l)	2.57 (2.21, 3.02)	2.68 (2.37, 3.04)	0.771
Triacylglycerols (mmol/l)	1.11 (0.911, 1.34)	1.17 (1, 1.36)	0.756

The study subjects, patients as well as controls, did not use any drug known to interfere with the steroid biosynthesis and catabolism, especially corticoids, selective serotonin reuptake inhibitors, estrogens, hormone replacement therapy and nonsteroidal anti-inflammatory drugs.

Participants were examined after signing an informed consent approved by the Ethics Committee of

the Institute of Endocrinology. For the evaluation of basic biochemical parameters and steroid metabolome, 10 ml of blood was withdrawn on fasting in the morning. Blood samples were centrifuged and stored at  $-80^\circ\text{C}$  until analyzed.

### Anthropometric measurements

The waist to hip ratio (WHR) and body mass

index (BMI) were calculated. Body adiposity index (BAI), a surrogate measure of body fat, was calculated as described elsewhere (Freedman *et al.* 2012).

#### Analytical methods

The circulating levels of steroids and their polar conjugates were simultaneously measured using the previously described gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) method (Hill *et al.* 2010). In brief, the 1 ml of serum was extracted by 3 ml of diethyl-ether. The dry residue from the organic layer was partitioned between 1 ml of pentane and 1 ml of 80 % methanol-water mixture and the dry residue from the methanol-water layer was derivatized by 2 % of methoxylamine-hydrochloride in pyridine and then silylated by N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide with 1 % of trimethylchlorosilane. The polar layer from the diethyl-ether extraction was hydrolyzed using the method by Dehennin *et al.* (1996) and then processed like the unconjugated steroids. Steroid polar conjugates contain mainly sulfates and glucuronides. In this study, we focused on the steroids in which the sulfates dominate over glucuronides such as  $\Delta^5$  steroids (adrenal gland pathway) and 5 $\alpha$ -reduced C21 and C19 steroid metabolites.

Triacylglycerols, total cholesterol, and HDL-cholesterol were assayed by enzymatic colorimetric test, glycated hemoglobin A1c (HbA1c) was assayed by turbidimetric inhibition method (Roche, Cobas 6000). LDL-cholesterol was calculated as total cholesterol minus (triacylglycerols divided by 2.2) minus HDL-cholesterol.

#### Statistical analysis

Respecting the skewed distribution and non-constant variance in most dependent variables, these were transformed by power transformations to data symmetry and homoscedasticity prior further processing (Meloun *et al.* 2000). The homogeneity and distribution of the transformed data was checked by residual analysis as described elsewhere (Meloun *et al.* 2002).

To correctly explain the relationships between steroids, than product to precursor ratio (sulfates to unconjugated steroids ratio) and presence of AD for both genders, we used age- and BMI-adjusted ANCOVA with factors AD and gender. Anthropometric characteristics were evaluated using one-way ANOVA. Statistical software Statgraphics Centurion, version XV from Statpoint Inc. (Herndon, Virginia, USA) was used for ANOVA and ANCOVA testing.

## Results

The differences between the ratios of conjugated to unconjugated steroids (C/U) in AD patients and controls with respect to gender are shown in Table 2.

As illustrated in Table 2, the C/U of the C21 steroids do not exhibit significant alterations in AD patients. On the other hand, the C/U of the  $\Delta^5$  C19 steroid DHEA and its 5 $\alpha$ -reduced metabolites with a dominance of sulfates over the glucuronides (androsterone, epiandrosterone, 5 $\alpha$ -androstane-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol, 5 $\alpha$ -androstane-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol) are consistently lower in AD patients. Some C/U are significantly higher in men (pregnenolone, isopregnanolone, DHEA, epiandrosterone, 5 $\alpha$ -androstane-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol) and the C/U in the androsterone negatively correlate with age. BMI do not significantly influence the values of C/U.

## Discussion

Steroids are recognized as important components in the pathophysiology of AD. Although their role has been widely studied, the corresponding metabolomic data are limited (Maggio *et al.* 2015). To our knowledge, this study is the first attempt to evaluate the role of steroid sulfotransferase SULT2A1 in the pathophysiology of AD on the basis of steroid metabolome in the circulation. For this purpose we have selected the unconjugated steroids and their conjugated counterparts in which the sulfation catalyzed by SULT2A1 dominates over glucuronidation. Therefore we omit the 5 $\beta$ -reduced steroids, in which the glucuronidation is comparable with sulfation (Brochu and Belanger 1987). Furthermore, estrogens, which are extensively sulfated by estrogen preferring sulfotransferase SULT1E1, are also omitted (Tibbs *et al.* 2015). To estimate a general trend of SULT2A1 activity in AD patients, we have compared the ratios of steroid conjugates to their unconjugated counterparts (C/U) in controls and AD patients for individual circulating steroids after adjustment for age and BMI using the ANCOVA model.

Our results showing decreased C/U in the C19 steroids demonstrate at least an association between attenuated sulfation of C19 steroids in adrenal *zona reticularis* and the pathophysiology of AD. These data are compatible with the concept of "older" *zona reticularis* in AD patients compared with controls. Numerous studies demonstrate decline in adrenal androgen production with advancing age and an

**Table 2.** Ratios of conjugated steroids to their unconjugated counterparts in the circulation in patients with Alzheimer's disease (AD) and in controls.

Conjugated to unconjugated steroids (C/U)	Mean (95 % confidence limits)		ANCOVA (p-values)			
	Women Controls: n=22 AD: n=16	Men Controls: n=11 AD: n=18	AD	Gender	Age	BMI
<i>Pregnenolone sulfate/ pregnenolone</i>	Controls	73 (60, 89)	0.451	<b>0.003</b>	0.574	0.054
	AD	46 (38, 55)				
<i>Allopregnanolone sulfate/ allopregnanolone</i>	Controls	27 (22, 33)	0.285	0.089	0.830	0.764
	AD	25 (21, 30)				
<i>Isopregnanolone sulfate/ isopregnanolone</i>	Controls	69 (58, 82)	0.219	<b>0.001</b>	0.364	0.418
	AD	40 (33, 48)				
<i>DHEAS/ DHEA</i>	Controls	121 (102, 143)	<b>0.046</b>	< <b>0.001</b>	0.735	0.361
	AD	81 (65, 100)				
<i>Androstenediol sulfate/ androstenediol</i>	Controls	455 (358, 589)	0.109	0.347	0.409	0.122
	AD	301 (230, 400)				
<i>Androsterone sulfate/ androsterone</i>	Controls	1894 (1561, 2268)	<b>0.037</b>	0.227	<b>0.005</b>	0.501
	AD	1162 (876, 1498)				
<i>Epiandrosterone sulfate/ epiandrosterone</i>	Controls	374 (312, 443)	<b>0.016</b>	< <b>0.001</b>	0.103	0.982
	AD	211 (160, 269)				
<i>5<math>\alpha</math>-Androstane-3<math>\alpha</math>,17<math>\beta</math>-diol sulfate/ 5<math>\alpha</math>-androstane-3<math>\alpha</math>,17<math>\beta</math>-diol</i>	Controls	301 (231, 391)	<b>0.006</b>	<b>0.011</b>	0.329	0.573
	AD	168 (118, 236)				
<i>5<math>\alpha</math>-Androstane-3<math>\beta</math>,17<math>\beta</math>-diol sulfate/ 5<math>\alpha</math>-androstane-3<math>\beta</math>,17<math>\beta</math>-diol</i>	Controls	1100 (874, 1357)	<b>0.048</b>	0.114	0.067	0.071
	AD	834 (611, 1098)				

Evaluated by ANCOVA with Age and BMI as covariates and AD diagnosis and Gender as factors.

analogous diminution in the area represented by the *zona reticularis*, which is regulated by extra-adrenal modulators such as corticoliberin, adrenocorticotrophic hormone, insulin, and transforming growth factor  $\beta$  (Auchus 2004, Dharia and Parker 2004, Ibanez *et al.* 1999, Sulcova *et al.* 1997). Although the DHEA is unlikely to have influence on the cognitive abilities in AD patients (Maggio *et al.* 2015), a variety of studies demonstrate higher prevalence of degenerative disorders, including AD, and other report neuro-protective and anti-aging effects of DHEA/DHEAS and possible corresponding mechanisms of DHEA/DHEAS actions (Hildreth *et al.* 2013, Lu *et al.* 2003, Traish *et al.* 2011, Hill *et al.* 2014a, Maggio *et al.* 2015, Starka *et al.* 2015). Furthermore, adrenal androgens serve as precursors of potent androgens or estrogens in target tissues (Labrie 2003).

Our results are in accordance with previous data indicating attenuated activity of *zona reticularis* in AD (Aldred and Mecocci 2010, Bernardi *et al.* 2000, Hillen *et al.* 2000, Kim *et al.* 2003, Nasman *et al.* 1991, Weill-Engerer *et al.* 2002). Furthermore, some authors report attenuated levels of adrenal androgens in C19 steroids and particularly their sulfates in body fluids and brain tissues of AD patients (Yanase *et al.* 1996) and others report lower DHEAS levels in subjects in which the AD developed during the prospective study. The latter authors also suggest the attenuated activity of *zona reticularis* as an important factor in the pathophysiology of AD (Ponholzer *et al.* 2009).

Concerning the extra-adrenal factors influencing the balance between sulfated and unconjugated steroids, SULT2A1 is also highly expressed in the liver and have an important detoxification function in the liver metabolism. Patients suffering from some liver disorders such as alcohol cirrhosis exhibit suppressed SULT2A1 activity (Yalcin *et al.* 2013). Decreased SULT2A1 activity was also described in human with acute sepsis (Kim *et al.* 2004). However, none of volunteers included in our study suffered from these pathologies. Regarding the effect of polymorphisms in *SULT2A1* gene on the balance between sulfated and unconjugated steroids, some studies report no such association in healthy subjects from the general population (Goodarzi *et al.* 2007, Haring *et al.* 2013).

The certain contradiction of the study is the absence of analogous significant between group differences in the C/U of C21 steroids, which might be ascribed to lower stability in the case of C21  $\Delta^5$  steroids

as the pregnenolone and its sulfate are the precursors of all remaining steroids and undergo a rapid metabolism with high inter-individual variation in individual metabolic steps, while the sulfates of C19-steroids and particularly of their  $5\alpha$ -reduced catabolites are more stable. The absence of significant between group differences in the C/U of  $5\alpha$ -reduced pregnanolone isomers and allopregnanolone of AD may be explained by an effect of inter-individual variability in further metabolism of these steroids to the corresponding sulfated pregnanediols, which are end products of progesterone catabolism.

Some steroid C/U (pregnenolone, isopregnanolone, DHEA, epiandrosterone and  $5\alpha$ -androstane- $3\alpha,17\beta$ -diol) are higher in men, perhaps due to influence of testicular steroidogenesis on the balance between sulfated and unconjugated forms of the steroids. The C/U investigated mostly do not correlate with age except the C/U for androsterone, which may be ascribed to relative homogeneity of the sample as concerns the age. This may be also the reason why BMI does not significantly influence the values of the steroid C/U.

In conclusion, the present study demonstrating an association between attenuated sulfation of C19 steroids in adrenal *zona reticularis* and the pathophysiology of AD is compatible with the concept of "older" *zona reticularis* in AD patients compared with controls.

### Conflict of Interest

There is no conflict of interest.

### Acknowledgements

This study was supported by the Grant IGA NT/13543-4 of the Czech Ministry of Health.

### Abbreviations

AD, Alzheimer's disease; ANCOVA, analysis of covariance; ANOVA, analysis of variance; BAI, body adiposity index; BMI, body mass index; CBG, corticosteroid binding globulin; C/U, conjugates to unconjugated counterparts ratio; C19, C21, carbon number of steroid; DHEA, dehydroepiandrosterone; DHEAS, dehydroepiandrosterone sulfate; GABA, gamma-aminobutyric acid; GC-MS, gas chromatography-mass spectrometry; HbA1c, glycated hemoglobin (A1c); HDL, high density lipoprotein; LDL, low density lipoprotein; SHBG, sex hormone binding globulin;

SULT2A1, sulfotransferase family 2A, SULT1E1, sulfotransferase family 1E, estrogen-dehydroepiandrosterone preferring, member 1; preferring, member 1; WHR, waist to hip ratio.

## References

- ALDRED S, MECOCCI P: Decreased dehydroepiandrosterone (DHEA) and dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) concentrations in plasma of Alzheimer's disease (AD) patients. *Arch Gerontol Geriatr* **51**: e16-e18, 2010.
- AUCHUS RJ: Overview of dehydroepiandrosterone biosynthesis. *Semin Reprod Med* **22**: 281-288, 2004.
- BARKER EV, HUME R, HALLAS A, COUGHTRIE WH: Dehydroepiandrosterone sulfotransferase in the developing human fetus: quantitative biochemical and immunological characterization of the hepatic, renal, and adrenal enzymes. *Endocrinology* **134**: 982-989, 1994.
- BERGERON R, DE MONTIGNY C, DEBONNEL G: Potentiation of neuronal NMDA response induced by dehydroepiandrosterone and its suppression by progesterone: effects mediated via sigma receptors. *J Neurosci* **16**: 1193-1202, 1996.
- BERNARDI F, LANZONE A, CENTO RM, SPADA RS, PEZZANI I, GENAZZANI AD, LUISI S, LUISI M, PETRAGLIA F, GENAZZANI AR: Allopregnanolone and dehydroepiandrosterone response to corticotropin-releasing factor in patients suffering from Alzheimer's disease and vascular dementia. *Eur J Endocrinol* **142**: 466-471, 2000.
- BROCHU M, BELANGER A: Increase in plasma steroid glucuronide levels in men from infancy to adulthood. *J Clin Endocrinol Metab* **64**: 1283-1287, 1987.
- DEHENNIN L, LAFARGE P, DAILLY P, BAILLOUX D, LAFARGE JP: Combined profile of androgen glucuro- and sulfoconjugates in post-competition urine of sportsmen: a simple screening procedure using gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B Biomed Appl* **687**: 85-91, 1996.
- DHARIA S, PARKER CR JR: Adrenal androgens and aging. *Semin Reprod Med* **22**: 361-368, 2004.
- FREEDMAN DS, THORNTON JC, PI-SUNYER FX, HEYMSFIELD SB, WANG J, PIERSON RN JR, BLANCK HM, GALLAGHER D: The body adiposity index (hip circumference/height(1.5)) is not a more accurate measure of adiposity than is BMI, waist circumference, or hip circumference. *Obesity (Silver Spring)* **20**: 2438-2444, 2012.
- GOODARZI MO, ANTOINE HJ, AZZIZ R: Genes for enzymes regulating dehydroepiandrosterone sulfonation are associated with levels of dehydroepiandrosterone sulfate in polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* **92**: 2659-2664, 2007.
- HAMPL R, BICIKOVA M: Neuroimmunomodulatory steroids in Alzheimer dementia. *J Steroid Biochem Mol Biol* **119**: 97-104, 2010.
- HARING R, WALLASCHOFSKI H, TEUMER A, KROEMER H, TAYLOR AE, SHACKLETON CH, NAUCK M, VOLKER U, HOMUTH G, ARLT W: A SULT2A1 genetic variant identified by GWAS as associated with low serum DHEAS does not impact on the actual DHEA/DHEAS ratio. *J Mol Endocrinol* **50**: 73-77, 2013.
- HILDRETH KL, GOZANSKY WS, JANKOWSKI CM, GRIGSBY J, WOLFE P, KOHRT WM: Association of serum dehydroepiandrosterone sulfate and cognition in older adults: sex steroid, inflammatory, and metabolic mechanisms. *Neuropsychology* **27**: 356-363, 2013.
- HILL M, PARIZEK A, KANCHEVA R, DUSKOVA M, VELIKOVA M, KRIZ L, KLIMKOVA M, PASKOVA A, ZIZKA Z, MATUCHA P, MELOUN M, STARKA L: Steroid metabolome in plasma from the umbilical artery, umbilical vein, maternal cubital vein and in amniotic fluid in normal and preterm labor. *J Steroid Biochem Mol Biol* **121**: 594-610, 2010.
- HILL M, DUŠKOVÁ M, STARKA L: Dehydroepiandrosterone, its metabolites and ion channels. *J Steroid Biochem Mol Biol* **145**: 293-314, 2015.
- HILLEN T, LUN A, REISCHIES FM, BORCHELT M, STEINHAGEN-THIESSEN E, SCHAUB RT: DHEA-S plasma levels and incidence of Alzheimer's disease. *Biol Psychiatry* **47**: 161-163, 2000.
- HOLTZMAN DM, MORRIS JC, GOATE AM: Alzheimer's disease: the challenge of the second century. *Sci Transl Med* **3**: 77sr1, 2011.

- HUNT PJ, GURNELL EM, HUPPERT FA, RICHARDS C, PREVOST AT, WASS JA, HERBERT J, CHATTERJEE VK: Improvement in mood and fatigue after dehydroepiandrosterone replacement in Addison's disease in a randomized, double blind trial. *J Clin Endocrinol Metab* **85**: 4650-4656, 2000.
- IBANEZ L, POTAU N, MARCOS MV, DE ZEGHER F: Corticotropin-releasing hormone as adrenal androgen secretagogue. *Pediatr Res* **46**: 351-353, 1999.
- JAVITT NB, LEE YC, SHIMIZU C, FUDA H, STROTT CA: Cholesterol and hydroxycholesterol sulfotransferases: identification, distinction from dehydroepiandrosterone sulfotransferase, and differential tissue expression. *Endocrinology* **142**: 2978-2984, 2001.
- KIM SB, HILL M, KWAK YT, HAMPL R, JO DH, MORFIN R: Neurosteroids: Cerebrospinal fluid levels for Alzheimer's disease and vascular dementia diagnostics. *J Clin Endocrinol Metab* **88**: 5199-5206, 2003.
- KIM MS, SHIGENAGA J, MOSER A, GRUNFELD C, FEINGOLD KR: Suppression of DHEA sulfotransferase (Sult2A1) during the acute-phase response. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **287**: E731-E738, 2004.
- KRIZ L, BICIKOVA M, HILL M, HAMPL R: Steroid sulfatase and sulfuryl transferase activity in monkey brain tissue. *Steroids* **70**: 960-969, 2005.
- LABRIE F: Extragenadal synthesis of sex steroids: intracrinology. *Ann Endocrinol (Paris)* **64**: 95-107, 2003.
- LABRIE F: Drug insight: breast cancer prevention and tissue-targeted hormone replacement therapy. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* **3**: 584-593, 2007.
- LABRIE F: DHEA, important source of sex steroids in men and even more in women. *Prog Brain Res* **182**: 97-148, 2010.
- LIU S, WU H, XUE G, MA X, WU J, QIN Y, HOU Y: Metabolic alteration of neuroactive steroids and protective effect of progesterone in Alzheimer's disease-like rats. *Neural Regen Res* **8**: 2800-2810, 2013.
- LU SF, MO Q, HU S, GARIPPA C, SIMON NG: Dehydroepiandrosterone upregulates neural androgen receptor level and transcriptional activity. *J Neurobiol* **57**: 163-171, 2003.
- MAGGIO M, DE VITA F, FISICHELLA A, COLIZZI E, PROVENZANO S, LAURETANI F, LUCI M, CERESINI G, DALL'AGLIO E, CAFFARRA P, VALENTI G, CEDA GP: DHEA and cognitive function in the elderly. *J Steroid Biochem Mol Biol* **145**: 281-292, 2015.
- MAJEWSKA MD, DEMIRGOREN S, SPIVAK CE, LONDON ED: The neurosteroid dehydroepiandrosterone sulfate is an allosteric antagonist of the GABAA receptor. *Brain Res* **526**: 143-146, 1990.
- MCKHANN GM, KNOPMAN DS, CHERTKOW H, HYMAN BT, JACK CR JR, KAWAS CH, KLUNK WE, KOROSHETZ WJ, MANLY JJ, MAYEUX R, MOHS RC, MORRIS JC, ROSSOR MN, SCHELTENS P, CARRILLO MC, THIES B, WEINTRAUB S, PHELPS CH: 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. *Alzheimers Dement* **7**: 263-269, 2011.
- MELOUN M, HILL M, MILITKY J, KUPKA K: Transformation in the PC-aided biochemical data analysis. *Clin Chem Lab Med* **38**: 553-559, 2000.
- MELOUN M, MILITKY J, HILL M, BRERETON RG: Crucial problems in regression modelling and their solutions. *Analyst* **127**: 433-450, 2002.
- NAPOLITANO M, COSTA L, PIACENTINI R, GRASSI C, LANZONE A, GULINO A: 17beta-estradiol protects cerebellar granule cells against beta-amyloid-induced toxicity via the apoptotic mitochondrial pathway. *Neurosci Lett* **561**: 134-139, 2014.
- NASMAN B, OLSSON T, BACKSTROM T, ERIKSSON S, GRANKVIST K, VIITANEN M, BUCHT G: Serum dehydroepiandrosterone sulfate in Alzheimer's disease and in multi-infarct dementia. *Biol Psychiatry* **30**: 684-690, 1991.
- OTTERNESS DM, WIEBEN ED, WOOD TC, WATSON WG, MADDEN BJ, MCCORMICK DJ, WEINSHILBOUM RM: Human liver dehydroepiandrosterone sulfotransferase: molecular cloning and expression of cDNA. *Mol Pharmacol* **41**: 865-872, 1992.
- PARK-CHUNG M, WU FS, PURDY RH, MALAYEV AA, GIBBS TT, FARB DH: Distinct sites for inverse modulation of N-methyl-D-aspartate receptors by sulfated steroids. *Mol Pharmacol* **52**: 1113-1123, 1997.
- PARK-CHUNG M, MALAYEV A, PURDY RH, GIBBS TT, FARB DH: Sulfated and unsulfated steroids modulate gamma-aminobutyric acidA receptor function through distinct sites. *Brain Res* **830**: 72-87, 1999.



- PONHOLZER A, MADERSBACHER S, RAUCHENWALD M, JUNGWIRTH S, FISCHER P, TRAGL KH: Serum androgen levels and their association to depression and Alzheimer dementia in a cohort of 75-year-old men over 5 years: results of the VITA study. *Int J Impot Res* **21**: 187-191, 2009.
- PRINCE M, ALBANESE E, GUERCHET M, PRINA M: *World Alzheimer Report 2014*. Alzheimer's Disease International, London, UK, 2014, pp 1-99.
- ROSARIO ER, PIKE CJ: Androgen regulation of beta-amyloid protein and the risk of Alzheimer's disease. *Brain Res Rev* **57**: 444-453, 2008.
- RUITENBERG A, OTT A, VAN SWIETEN JC, HOFMAN A, BRETELIER MM: Incidence of dementia: does gender make a difference? *Neurobiol Aging* **22**: 575-580, 2001.
- SCHUMACHER M, MATTERN C, GHOUMARI A, OUDINET JP, LIERE P, LABOMBARDA F, SITRUK-WARE R, DE NICOLA AF, GUENNOUN R: Revisiting the roles of progesterone and allopregnanolone in the nervous system: resurgence of the progesterone receptors. *Prog Neurobiol* **113**: 6-39, 2014.
- SHIMADA M, YOSHINARI K, TANABE E, SHIMAKAWA E, KOBASHI M, NAGATA K, YAMAZOE Y: Identification of ST2A1 as a rat brain neurosteroid sulfotransferase mRNA. *Brain Res* **920**: 222-225, 2001.
- STARKA L, DUSKOVA M, HILL M: Dehydroepiandrosterone: a neuroactive steroid. *J Steroid Biochem Mol Biol* **145**: 254-260, 2015.
- STROTT CA: Steroid sulfotransferases. *Endocr Rev* **17**: 670-697, 1996.
- STROTT CA: Sulfonation and molecular action. *Endocr Rev* **23**: 703-732, 2002.
- SULCOVA J, HILL M, HAMPL R, STARKA L: Age and sex related differences in serum levels of unconjugated dehydroepiandrosterone and its sulphate in normal subjects. *J Endocrinol* **154**: 57-62, 1997.
- TIBBS ZE, ROHN-GLOWACKI KJ, CRITTENDEN F, GUIDRY AL, FALANY CN: Structural plasticity in the human cytosolic sulfotransferase dimer and its role in substrate selectivity and catalysis. *Drug Metab Pharmacokinet* **30**: 3-20, 2015.
- TRAISH AM, KANG HP, SAAD F, GUAY AT: Dehydroepiandrosterone (DHEA) - a precursor steroid or an active hormone in human physiology. *J Sex Med* **8**: 2960-2982; quiz 2983, 2011.
- VALLEE M, MAYO W, LE MOAL M: Role of pregnenolone, dehydroepiandrosterone and their sulfate esters on learning and memory in cognitive aging. *Brain Res Brain Res Rev* **37**: 301-312, 2001.
- WEILL-ENGERER S, DAVID JP, SAZDOVITCH V, LIERE P, EYCHENNE B, PIANOS A, SCHUMACHER M, DELACOURTE A, BAULIEU EE, AKWA Y: Neurosteroid quantification in human brain regions: comparison between Alzheimer's and nondemented patients. *J Clin Endocrinol Metab* **87**: 5138-5143, 2002.
- WINKLER JM, FOX HS: Transcriptome meta-analysis reveals a central role for sex steroids in the degeneration of hippocampal neurons in Alzheimer's disease. *BMC Syst Biol* **7**: 51, 2013.
- YAFFE K, LUI LY, GRADY D, CAULEY J, KRAMER J, CUMMINGS SR: Cognitive decline in women in relation to non-protein-bound oestradiol concentrations. *Lancet* **356**: 708-712, 2000.
- YALCIN EB, MORE V, NEIRA KL, LU ZJ, CHERRINGTON NJ, SLITT AL, KING RS: Downregulation of sulfotransferase expression and activity in diseased human livers. *Drug Metab Dispos* **41**: 1642-1650, 2013.
- YANASE T, FUKAHORI M, TANIGUCHI S, NISHI Y, SAKAI Y, TAKAYANAGI R, HAJI M, NAWATA H: Serum dehydroepiandrosterone (DHEA) and DHEA-sulfate (DHEA-S) in Alzheimer's disease and in cerebrovascular dementia. *Endocr J* **43**: 119-123, 1996.

## Přílohy – prezentace

### Prezentace na mezinárodních konferencích

4. B. Bendlová, J. Včelák, D. Vejražková, P. Lukášová, G. Vacínová, O. Bradnová, K. Dvořáková, M. Vaňková, R. Rusina, I. Holmerová. (2014): The plasma levels of adipokines and incretins in patients with Alzheimer's disease. *50th EASD. Vídeň, Rakousko. Diabetologia 57: (Suppl 1) S249. Poster*
5. Včelák J., Vejražková D., Lukášová P., Bradnová O., Vacínová G., Dvořáková K., Bendlová B., Vaňková M. (2014): Hladiny adipokinů a inkretinů u nemocných s Alzheimerovou demencí. *XXXVII. Endokrinologické dni. Žilina, Slovensko. Interná medicína 14: (Suplement) 21-22. Přednáška*
6. Vaňková M., Včelák J., Vejražková D., Lukášová P., Bradnová O., Vacínová G., Bendlová B., M. Hill. (2014): Prediktivita cirkulujících steroidů v diagnostice Alzheimerovy nemoci. *XXXVII. Endokrinologické dni. Žilina, Slovensko. Interná medicína 14: (Suplement) 27-28. Přednáška*
7. Bendlova B., Vejrazkova D., Lukasova P., Bradnova O., Vacinova G., Dvorakova K., Hill H., Vcelak J., Rusina R., Holmerova I., Vankova M. (2015): Neuroactive steroids as predictive markers for Alzheimer's disease. *17th European Congress of Endocrinology. Dublin, Ireland. Poster*

### Prezentace na domácích konferencích

8. Vaňková M., Vejražková D., Lukášová P., Bradnová O., Vacínová G., Dvořáková K., Hill M., Včelák J., Bendlová B. (2014): Vztah neuroaktivních steroidů a glukózové tolerance u pacientů s Alzheimerovou chorobou a zdravých seniorů. *L. Diabetologické dny. Luhačovice. DMEV 17: (suppl) 24. Přednáška*
9. Vacínová G., Vaňková M., Bradnová O., Vejražková D., Bešťák J., Lukášová P., Včelák J., Rusina R., Bendlová B. (2015): Spektrum volných mastných kyselin u pacientů s Alzheimerovou nemocí a u zdravých seniorů v závislosti na přítomnosti diabetu 2. typu. *LI. Diabetologické dny. Luhačovice. DMEV 18: (suppl) 49. Poster*
10. Vaňková M., Vejražková D., Lukášová P., Bradnová O., Vacínová G., Dvořáková K., Včelák J., Rusina R., Vaňková H., Holmerová I., Bendlová B. (2015) Glukózová tolerance a metabolický profil u pacientů s Alzheimerovou nemocí. *LI. Diabetologické dny. Luhačovice. DMEV 18: (suppl) 39. Přednáška*

11. Vacínová G., Včelák J., Vejražková D., Lukášová P., Bradnová O., Bendlová B., Vaňková M. (2015): Sekvenování nové generace v genetice Alzheimerovy nemoci. *XXXVIII. Endokrinologické dny. Špindlerův Mlýn. Poster*
12. Vaňková M., Hill M., Velíková M., Včelák J., Vacínová G., Lukášová P., Vejražková D., Dvořáková K., Rusina R., Holmerová I., Vaňková H., Bendlová B. (2015): Snížená aktivita enzymu SULT2A1 u pacientů s Alzheimerovou nemocí. *XXXVIII. Endokrinologické dny. Špindlerův Mlýn. Přednáška*
13. Vacínová G., Včelák J., Vejražková D., Lukášová P., Bendlová B., Vaňková M. Hladiny CCL5/RANTES u pacientů s Alzheimerovou nemocí a u zdravých seniorů. *40. Endokrinologické dny. Praha. Poster*

## MINUTES OF THE 49th GENERAL ASSEMBLY OF THE EUROPEAN ASSOCIATION FOR THE STUDY OF DIABETES

held in the Pi i Sunyer Hall, Fira de Barcelona, Barcelona, Spain on Thursday 26 September, 2013 at 18:30

Present:	<b>Dr. Andrew J.M. Boulton</b>	<b>(President)</b>
	<b>Dr. Stefano Del Prato</b>	<b>(Vice President)</b>
	<b>Dr. Bernard Thorens</b>	<b>(Vice President)</b>
	<b>Dr. Michael Roden</b>	<b>(Honorary Treasurer)</b>
	<b>Dr. Mark Walker</b>	<b>(Honorary Secretary)</b>
	<b>Dr. Cees J. Tack</b>	<b>(Chair, PGEC)</b>
	<b>Dr. Viktor Jörgens</b>	<b>(Executive Director)</b>
	<b>Dr. Monika Grüsser</b>	<b>(Vice Director)</b>
	<b>and 51 members</b>	

The President, Dr. Boulton, welcomed everyone to the 49th General Assembly. He asked those present to stand in memory of the following members, who had passed away: Drs. Georg Eisenbarth, John Hutton, Harry Keen, Carol Lurie, Irina G. Obrosova, Samuel Rahbar, Jean-Louis Richard, Richard Rubin and Patrick Vexiau.

### 1. MINUTES 48th GENERAL ASSEMBLY 2012

Since there were no comments, the minutes were unanimously approved and officially signed as a correct record.

### 2. REPORTS

#### a) President

The President's report to the members on the activities of EASD was given in the President's Address before the Minkowski Lecture. It is available under: <http://www.easdvirtualmeeting.org/resources/6926>

The President announced the Claude Bernard Lecturer 2014: Dr. Domenico Accili.

The President announced the Medical Devices in Diabetology meeting on 26/27 February 2014. He said better post-marketing surveillance was required and the Swedish project of regulating pumps would be looked at.

The President expressed his thanks to all partners. Dr. Boulton reported that as expected the EASD Annual Meeting in Barcelona was doing very well and the number of delegates attending had slightly increased. Dr. Boulton

thanked all members of the EASD Office and the Executive Committee for their commitment and hard work.

#### b) Honorary Treasurer

i) Result of tax audit 2008-2010/actions to be taken  
In autumn 2012 for the second time, a control of the EASD by the Inland Revenue took place. These controls will always occur every three years due to the large turnover of the Association. In August 2013, EASD received the draft conclusion of this tax control. The non-profit status of the EASD is beyond all question; the main issue is the question of the taxation of the income from industry exhibition and symposia. EASD itself does not handle the industry exhibition and the symposia organized by third parties; these activities are taken care of by a professional congress organizer which is actually Interplan in Munich. In common with other medical associations in Germany, EASD has a contract, in our case with Interplan, giving them permission to organize these activities on their own responsibility without interfering with EASD concerning the organization and the fund raising. The basis of this collaboration is a loan contract and the income from such a loan contract is considered to be tax free. This legal and taxation construction is the basis of a healthy financial situation of German academic medical societies. The Düsseldorf tax authorities questioned this regulation and even asked their superiors for comments. In August 2013, they came up with the opinion that all incomes of EASD from these loan contracts, starting with 2008, are considered by the Inland Revenue as a taxable income. Taking into account corporation and local business tax, the result is that a total of Euro 5.4 million will likely have to be paid at the beginning of 2014. Following the advice of legal and

with HOMA-IR was abolished ( $-0.077$ ,  $p=0.121$ ). Furthermore, when HOMA-IR was corrected for, the inverse association between android % fat and IGFBP1 was retained ( $-0.241$ ,  $p=9.2 \times 10^{-7}$ ). By contrast, gynoid % fat was inversely associated with HOMA-IR after controlling for total fat mass ( $-0.154$ ,  $p=1.8 \times 10^{-3}$ ) and the association with IGFBP1 was abolished ( $0.095$ ,  $p=0.054$ ). These findings could not be replicated using anthropometric measures of regional fat depots. For example, after adjusting for total fat mass, waist circumference was equally associated with HOMA-IR ( $0.116$ ,  $p=1.9 \times 10^{-2}$ ) and IGFBP1 ( $-0.113$ ,  $p=2.3 \times 10^{-3}$ ). In females, after controlling for total fat mass, android and gynoid % fat also displayed opposite directions of association with HOMA-IR (android:  $0.124$ ,  $p=1.4 \times 10^{-2}$ ; gynoid:  $-0.197$ ,  $p=9.0 \times 10^{-5}$ ) and IGFBP1 (android:  $-0.145$ ,  $p=4.2 \times 10^{-3}$ ; gynoid:  $0.161$ ,  $p=1.4 \times 10^{-3}$ ) however the strength of association was similar for both depots.

**Conclusion:** Our findings highlight the advantage of quantifying specific fat depots by DXA over anthropometric measures when assessing insulin resistance. In males, hepatic insulin resistance (assessed by IGFBP1) was independently associated with greater android fat content whereas whole-body insulin resistance (HOMA-IR) was associated with diminished gynoid fat content. These findings lend further support to the paradoxical relationship between diabetes risk and body fat distribution.

Supported by: NIHR Biomedical Research Centre

## 601

### A study of the mechanisms through which the biogenesis of adiponectin is regulated in white adipose tissue

L. Zhang<sup>1</sup>, M.M. Li<sup>1</sup>, M. Corcoran<sup>1</sup>, S. Zhang<sup>1</sup>, G.J.S. Cooper<sup>1,2</sup>;

<sup>1</sup>School of Biological Sciences, University of Auckland, New Zealand,

<sup>2</sup>Manchester Biomedical Research Centre, University of Manchester, UK.

**Background and aims:** Adiponectin is an adipose tissue-derived hormone with anti-diabetic, anti-atherogenic and anti-inflammatory functions. Defects in adiponectin multimerization are associated with decreased adiponectin levels, obesity and insulin resistance. In this study, we investigated the enzyme systems responsible for adiponectin multimerization and production, and other factors also contributing to this process.

**Materials and methods:** OB mice (10- or 27-week) and age-matched C57 controls were used in this study. Fully differentiated 3T3-L1 adipocytes were also used. Quantitative real time-PCR was performed to measure the mRNA expression levels of a number of genes in white lipid tissue (WAT) from mice and 3T3-L1 adipocytes. ELISA/western blots were used to measure the expression of relative protein levels. Statistical analysis was performed by *t*-test or analysis of variance (ANOVA) with appropriate post-hoc tests.

**Results:** In fully-differentiated 3T3-L1 adipocytes, we observed that decreased insulin signalling caused by blocking the insulin receptor (InsR) with a blocking anti-InsR antibody, increased extracellular adiponectin levels, whereas coexisting hyperinsulinaemia counteracted this effect. Blocking the adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) pathway by using an inhibitor (compound C) significantly decreased extracellular adiponectin levels. Furthermore, we demonstrated the expression of lysyl hydroxylases (LHs), prolyl hydroxylases (PHs) and glycosyltransferase 25-domain-containing proteins 1&2 (Glt25D1&2) in the WAT of mice. Expression of LH3 was markedly increased in the WAT of OB mice compared with controls. In differentiated 3T3-L1 adipocytes, non-specific inhibition of LHs and PHs by the hydroxylase inhibitor, dipyriddyil markedly suppressed adiponectin production, particularly of the higher molecular-weight isoforms, but increased the low molecular-weight isoform. Specific inhibition of prolyl-4-hydroxylase (P4H) with ethyl-3,4-dihydroxybenzoate had effects comparable to dipyriddyil; however, it had different effects on the intracellular composition of adiponectin isoforms. Specific inhibition of LHs with minoxidil also suppressed adiponectin production, especially of the high molecular-weight (HWM) isoform. In addition, transient gene knock-down of LH3 (*Plod3*) suppressed adiponectin production, especially of the HMW isoform. **Conclusion:** Our results indicate that: hyperinsulinaemia and decreased insulin signalling exert countervailing effects on adiponectin production; AMPK pathway signalling also regulates adiponectin production; both PHs and LHs are required for adiponectin production; and the hydroxylation/glycosylation of lysyl residues and hydroxylation of prolyl residues are essential for formation and secretion of higher-order adiponectin isoforms.

Supported by: Health Research Council of New Zealand

## 602

### The plasma levels of adipokines and incretins in patients with Alzheimer's disease

B. Bendlová<sup>1</sup>, J. Vcelak<sup>1</sup>, D. Vejrazkova<sup>1</sup>, P. Lukasova<sup>1</sup>, O. Bradnova<sup>1</sup>, K. Dvorakova<sup>1</sup>, G. Vacinova<sup>1</sup>, R. Rusina<sup>2</sup>, I. Holmerova<sup>2</sup>, M. Vankova<sup>1</sup>;

<sup>1</sup>Molecular Endocrinology, Institute of Endocrinology,

<sup>2</sup>Neurology, Thomayer Hospital,

<sup>3</sup>Faculty of Humanities, Charles University, Prague, Czech Republic.

**Background and aims:** Alzheimer's disease (AD) is linked to type 2 diabetes (T2D). T2D is a risk factor for vascular dementia but also for a progressive neuron damage, which is probably associated with insulin resistance in central nervous system. AD is therefore sometimes called "diabetes of the brain". The aim of the study was to compare the plasma levels of adipokines, incretins and other biomarkers associated with T2D in AD patients and in non-diabetic subjects without pathological changes in the brain.

**Materials and methods:** The study included 38 females (19 age and BMI matched pairs AD patient and control; age  $70 \pm 8$  years and BMI  $26.4 \text{ kg/m}^2$ ) and 24 males (12 age and BMI matched pairs AD patient and control; age  $67 \pm 7$  years and BMI  $27.3 \text{ kg/m}^2$ ) who underwent neuropsychological examination and magnetic resonance imaging of the brain. The characteristics of fasting glucose and lipid metabolism and parameters of body composition including body adiposity index (BAI) were determined. Multiplex methods for evaluation of fasting plasma biomarkers were used: Bio-Plex ProHuman Diabetes 10-Plex Assay - C-peptide, ghrelin, GIP, GLP-1, glucagon, insulin, leptin, total PAI-1, resistin, visfatin and Bio-Plex ProHuman Diabetes Adipin and Adiponectin Assays (Bio-Rad). Statistical analyses were performed using NCSS 2004 software (ANOVA).

**Results:** Compared groups of AD patients and controls (men/women separately) did not differ in either age, BMI, WHR, waist and abdomen circumferences, body adiposity index (BAI) or insulin resistance (HOMAR). In women, AD patients had significantly higher levels of visfatin ( $p=0.0006$ ), ghrelin ( $p=0.03$ ), GLP-1 ( $p=0.006$ ) and glucagon ( $p=0.00002$ ) compared with control women. Similar results were found in men, they had higher levels of visfatin ( $p=0.02$ ) and ghrelin ( $p=0.02$ ) compared with control men, GLP-1 and glucagon did not reach statistical significance.

**Conclusion:** Alzheimer's disease is associated with increased levels of plasma visfatin, ghrelin, GLP-1 and glucagon. Plasma visfatin is a pro-inflammatory cytokine that increases risk of endothelial cell deterioration due to the inflammation and oxidative stress. Visfatin is a marker of ageing and age-dependent diseases. Ghrelin, GLP-1 and glucagon are considered as neuroprotective hormones. Dysregulation of these hormones in AD could be caused by impaired secretion/degradation and/or resistance of the target tissues.

Supported by: IGA MH CZ NT/13543/4, NT/13544/4, MH CZ 00023761

## 603

### Anti-TNF therapy has a possible favorable effect on insulin sensitivity in non-diabetic, non-obese patients with inflammatory bowel disease

S.A. Paschou<sup>1</sup>, F. Kothonas<sup>2</sup>, A. Myroforidis<sup>2</sup>, V. Loi<sup>1</sup>, T. Terzi<sup>1</sup>, O. Karagianni<sup>1</sup>, A. Poulou<sup>2</sup>, K. Goumas<sup>2</sup>, A. Vryonidou<sup>1</sup>;

<sup>1</sup>Department of Diabetes and Endocrinology, <sup>2</sup>Department of Gastroenterology, Hellenic Red Cross Hospital, Athens, Greece.

**Background and aims:** Insulin resistance is very common in autoimmune systemic diseases and recently it was also found in children and adults with inflammatory bowel disease (IBD). Inflammation and insulin resistance are closely linked, and inflammatory cytokines such as tumor necrosis factor alpha (TNF $\alpha$ ) may inhibit insulin signaling and promote insulin resistance. The aim of this study was to investigate the effect of anti-TNF therapy on glucose and lipid metabolism in non-diabetic, non-obese patients with IBD.

**Materials and methods:** We studied 41 patients with IBD (25M/16F,  $36.4 \pm 11$  (19-64) years old, 28 with Crohn's disease and 13 with ulcerative colitis), without known history of diabetes. Eighteen patients (9M/9F,  $33.6 \pm 8.8$  years) were on anti-TNF therapy for more than 1 year, while the other 23 patients (16M/7F,  $38.7 \pm 12.5$  years) were treated with azathioprine and mesalazine (Aza/Mes). Nine of the patients from the second group were then treated with anti-TNF and studied again 6 months after. Fasting glucose, insulin, c-peptide, HbA1c, lipids, and CRP levels were determined and HOMA-IR index was calculated, in all patients. Statistical analysis of the data was performed using SPSS 16.00.

**Results:** Three of the patients were diagnosed with overt diabetes and were excluded from the analysis. Patients from the two therapy groups were

# The plasma levels of adipokines and incretins in patients with Alzheimer's disease

B. Bendlová<sup>1</sup>, J. Včelák<sup>1</sup>, D. Vejražková<sup>1</sup>, P. Lukášová<sup>1</sup>, G. Vacínová<sup>1</sup>, O. Bradnová<sup>1</sup>, K. Dvořáková<sup>1</sup>, M. Vaňková<sup>1</sup>, R. Rusina<sup>1</sup>, J. Holmerová<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Institute of Endocrinology, Prague; <sup>2</sup>Thomayer Hospital, Prague; <sup>3</sup>Faculty of Humanities, Charles University, Prague

## Background and aims:

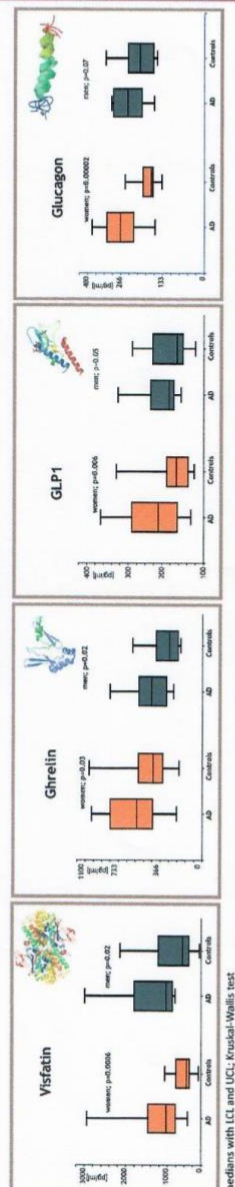
Alzheimer's disease (AD) is linked to type 2 diabetes (T2D). T2D is a risk factor for vascular dementia but also for a progressive neuron damage, which is probably associated with insulin resistance in central nervous system. AD is therefore sometimes called as "diabetes of the brain".

The aim of the study was to compare the plasma levels of adipokines, incretins and other biomarkers associated with T2D in AD patients and in age and BMI matched non-diabetic subjects without pathological changes in the brain.

## Methods:

- Neuropsychological examination
- Brain MRI for exclusion or confirmation of neurological diagnosis
- Glucose and lipid metabolism
- Anthropometric examination
- Family and personal history
- For the determination of hormones multiplex kits were used (BioRad):
  - Bio-Plex ProHuman Diabetes 10-Plex Assay (C-peptide, ghrelin, GIP, GLP-1, glucagon, insulin, leptin, total PAF-1, resistin, visfatin)
  - Bio-Plex ProHuman Diabetes Adipain and Adiponectin Assays
- Statistical software NCS5 2004 (Kruskal-Wallis One-Way ANOVA on Ranks)

## Results:



## Conclusions:

Alzheimer's disease was associated with increased levels of plasma insulin, visfatin, ghrelin, GLP-1 and glucagon. Plasma visfatin is a pro-inflammatory cytokine and it is a marker of ageing and age-dependent diseases. Ghrelin, GLP-1 and glucagon are considered as neuroprotective hormones. Dysregulation of these hormones in AD could be associated with impaired insulin action and could be also caused by impaired secretion/degradation and/or resistance of the target tissues to their actions.

Supported by grants IGA MHC NT/13543/4, NT/13544/4, NH CZ 00023761. Contact: bendlov@endo.cz



## Insulin and neurodegeneration

- chronic peripheral hyperinsulinemia may downregulate insulin receptors at blood-brain barrier, impaired brain insulin uptake and/or insulin resistance results in learning, memory and cognition deficits
- impaired insulin function leads to neuronal low-protein hyperphosphorylation and accumulation of beta-amyloid precursor protein processing (beta-amyloid accumulation)

## Visfatin - not only a visceral fat-derived hormone

- 2005 - described a novel adipokine - visfatin (Visceral Fat Adipokine)
  - homologous with pRIF (Pro-B cell Colony-Enhancing Factor) and with NAMPT (Nicotinamide Phosphoribosyltransferase)
- key enzyme for the synthesis of nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) essential in many tissues and organs – brain, liver, bone marrow, skeletal muscle, adipose tissue
- insulin-mimetic effects, acts via insulin receptor
- higher plasma levels in obesity and T2D
- intracerebral NAMPT acts as an enzyme (protective to ischemic injury and neurodegeneration)
- extracellular s-NAMPT acts as a pro-inflammatory cytokine (risk of damage to the endothelial cells due to the inflammation and oxidative stress)

## Ghrelin - not only a hunger hormone

- 1999 described as stimulating hormone for growth hormone release
- affects appetite and eating habits
- regulation of glucose homeostasis by modulating insulin secretion and sensitivity
- posttranslational modification acyl ghrelin (AG) and unacyl-ghrelin (UAG) participates in neuroprotection, as well as the processes of memory and learning, binds to neurons and promotes their interconnection
- inhibits ROS formation and stabilizes mitochondrial membrane potential
- acts as a protective factor regardless of acylation (AG effect is mediated by GHS-R1a, UAG effect is mediated by CD36 receptor)

## GLP-1 (glucagon-like peptide 1) - not only an incretin

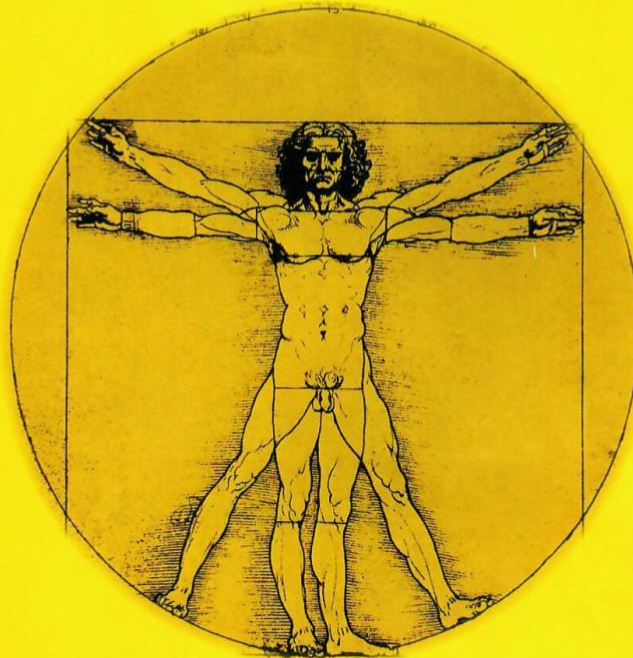
- synthesized in the intestine, but also in the brain, salivary glands and pancreas
  - stimulates glucose-induced insulin secretion and increased insulin gene expression
  - also stimulates secretion of somatostatin and inhibits glucagon secretion
- ### GLP-1 in the brain
- GLP-1 activity in the brain regulates hepatic gluconeogenesis and inhibition of lipogenesis (fat tissue or liver have not GLP-1R)
  - GLP-1 acts locally (paracrine effect) as neurotransmitter
  - inhibits apoptosis by reducing the expression of pro-apoptotic proteins – neuroprotection

## Glucagon

- antagonist of insulin, hypoglycemia is a stimulator for glucagon secretion
- secretion in pancreatic alpha-cells, L-cells of the intestine and in the hypothalamus

RECENZOVANÝ, POSTGRADUÁLNE ZAMERANÝ ODBORNÝ LEKÁRSKY ČASOPIS

# INTERNÁ MEDICÍNA



SUPLEMENT

**XXXVII. ENDOKRINOLOGICKÉ DNI**  
s medzinárodnou účasťou

a

**XVIII. KONGRES SLOVENSKEJ LEKÁRSKEJ SPOLOČNOSTI**

9.-11. október 2014, Žilina

• ABSTRAKTY PREDNÁŠOK •

ISSN 1335-8359

[www.samedi.sk](http://www.samedi.sk)

Časopis je indexovaný

v Slovenskej národnej bibliografii

**S**

Ročník 14/2014

álne provádí plastická rekonštrukčná chirurgická úprava (augmentácie prsů, penis, larynx).

Hormonálna substitučná liečba s cieľom zmeny postavy, hlasu, sekundárnych pohlavných charakteristik (u mužů vously) do výslednej premeny probíhá 2-3 roky, trvá však celoživotně.

U transsexuálných jedinců s plánovanou premenou *žena - muž (F-M)* je zahájena liečba androgeny; k dosaženiu plně virilizácie, účinkem na supresi gonadotropinů vede k zástave menštruače a atrofii prsou. Následuje chirurgická liečba s odnětím gonád, rekonštrukčná chirurgická operace. Pooperační období je i přes podávání androgenů provázeno klasickými výpadovými jevy z deficitu estrogenů. Parametry kostního metabolismu se posunují na hranici osteopenie. Při dlouhodobé liečbě androgeny však dochází do 1-2 let k zásadnímu ovlivnění spokojenosti pacienta (well-being) a požadovaným klinickým i biochemickým zmenám. Nástup těchto zmen je z časového hlediska individuální a závisí na toleranci hormonální liečby.

## GENETIKA II

### IDENTIFIKÁCIA GÉNU ZODPOVEDNÉHO ZA SYNDRÓM MEHMO

Stanik J.<sup>1,2</sup>, Škopková M.<sup>1</sup>, Staniková D.<sup>1,2</sup>, Ukropec J.<sup>1</sup>, Daniš D.<sup>1</sup>, Kurdiová T.<sup>1</sup>, Ukropecová B.<sup>1</sup>, Tichá L.<sup>2</sup>, Klimeš I.<sup>1</sup>, Gašperiková D.<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>DIABGENE a laboratórium diabetu a porůch metabolismu, ÚEE SAV, Bratislava

<sup>2</sup>1. detská klinika LFUK a DFNSP, Bratislava

<sup>3</sup>Molekulárne medicínske centrum SAV, Bratislava

Syndróm MEHMO je vzácnou poruchou, ktorú charakterizuje X-viazaná dedičnosť, mikrocefália, epilepsia, hypogonitizmus, mentálna retardácia, obezita a viaceré ďalšie endokrinné poruchy (hypopituitarizmus, diabetes). Doteraz boli opísané len 2 rodiny s touto poruchou, pričom sa identifikovala oblasť na chromozóme X, pravdepodobne zodpovedná za tento syndróm. Konkrétny gén doposiaľ identifikovaný nebol.

**Cieľom práce** bolo u pacienta s klinicky diagnostikovaným syndrómom MEHMO identifikovať genetickú príčinu ochorenia.

**Pacienti a metódy:** U 3,5-ročného chlapca so syndrómom MEHMO, diabetom a hypopituitarizmom sa vykonala DNA analýza celého exómu (všetkých kódujúcich úsekov celej jadrovej DNA) metódou sekvenovania novej generácie. Následná analýza zistených variantov sa sústredila na chromozóm X. Nález variantov sa overil aj pomocou priameho sekvenovania podľa Sangera.

**Výsledky:** DNA analýzou exómu sa identifikovalo 23 nepopísaných variantov na chromozóme X. Haplotypová analýza ukázala, že len 3 z nich sa nachádzajú aj u matky a matkinej matky a len jeden z nich - v géne *EIF2S3* - sa nachádzal v oblasti pôvodne asociovanej so syndrómom MEHMO. *EIF2S3* kóduje  $\gamma$  podjednotku eukaryotického iniciačného faktora translácie 2 (eIF2), ktorý sa podieľa na syntéze proteínov. Bodové mutácie v tomto géne boli v minulosti identifikované u niekoľkých rodín s mikrocefáliou a poruchou intelektu. U nášho pacienta, jeho matky a starej matky sa našla mutácia spôsobujúca posun čítacieho rámca, ktorý ovplyvňuje posledných 8 aminokyselín a zavádza predčasný stop-kodón, čím sa výsledný proteín skráti o 5 aminokyselín. In-silico analýzy potvrdili možný vplyv mutácie na fenotyp. V súčasnosti prebiehajú funkčné analýzy mutovaného proteínu.

**Záver:** Podľa našich výsledkov je syndróm MEHMO u nášho pacienta spôsobený mutáciou génu *EIF2S3*. Ide o prvú identifikáciu génu spôsobujúceho syndróm MEHMO

Podporené grantom APVV 0187-12 a APVV 0107-12.

### ÚLOHA TRH V REGULÁCII SEKREČIE INZULÍNU

Štrbák V., Bačová Z.

Ústav experimentálnej endokrinológie SAV a Ústav patologickej fyziológie, LF SZU, Bratislava

Tyreoliberin (L-pyroglutamyl-Histidyl-L-Prolineamide, TRH) bol pôvodne izolovaný ako hypotalamický hormón regulujúci sekreciu tyreotropného hormónu. Postupne sa ukázali ďalšie zdroje a účinky TRH v CNS, prostate, srdci, štítnej žľaze, GIT. 10 rokov po objavení štruktúry TRH bola v pankrease popísaná TRH imuno-reaktivita. V roku 1987 sme s pracoviskom v Marseille popísali perinatálny vývoj exprese génu pre TRH a koncentrácie TRH u potkana v pankrease. Vysoká koncentrácia týchto parametrov predchádza fyziologickej maturácii sekrečnej odpovede inzulínu na glukózu. Podanie streptozotocínu (STZ) vyvolá deštrukciu pankreatických  $\beta$  buniek. Perinatálne podanie je po počiatkovej deštrukcii sledovanej regeneráciou inzulín secerujúceho systému, TRH sa neobnovuje. Pankreatická odpoveď na glukózu však ostáva poškodená, používa sa ako model na diabetes mellitus II. typu. Knock out TRH génu u myši má za následok hyperglykémiu napriek tomu, že inzulínu majú dostatok. Chýba adekvátna sekrečná odpoveď na stimuláciu glukózou.

Snažili sme sa bližšie charakterizovať význam TRH pre sekrečnú odpoveď inzulínu. Zistili sme, že sekrečia pankreatického TRH je stimulovaná glukózou a inhibovaná inzulínom. Fyziologická dávka TRH (1 nM) neovplyvnila bazálnu ani stimulovanú sekreciu inzulínu zdravých potkanov. U dospelých zvierat sme inhibovali biosyntézu TRH podávaním disulfiramu (inhibitor PAM - enzým posledného kroku syntézy amidovaných peptidov - peptid  $\alpha$ -amidácie) po dobu 5 dní. Izolované pankreatické ostrovcy týchto potkanov mali veľmi nízku PAM aktivitu, vysoký obsah a bazálnu sekreciu inzulínu a neboli schopné reagovať na stimuláciu glukózou. Pridanie 1 nM TRH do média normalizovalo obsah inzulínu v ostrovcích, jeho bazálnu sekreciu aj odpoveď na stimuláciu glukózou.

**Záver:** Predpokladáme, že pri chýbaní TRH je vysoká bazálna sekrečia inzulínu a chýbanie odpovede na stimuláciu výsledkom presmerovania inzulínu z regulovanej sekrečnej cesty do konštitučnej. Pridanie TRH obnovilo regulovanú sekreciu. Tieto výsledky spolu s údajmi o účinkoch TRH podporujúcich regeneráciu  $\beta$  buniek ukazujú nádejnú možnosť jeho klinického využitia.

Práca bola podporená projektami APVV 0486-10, VEGA 2/0132/12 a Chicago Diabetes Project.

### HLADINY ADIPOKINŮ A INKRETINŮ U NEMOCNÝCH S ALZHEIMEROVOU DEMENCI

Včelák J., Vejražková D., Lukášová P., Bradnová O., Vacinová G., Dvořáková K., Bendlová B., Vaňková M.

Oddělení molekulární endokrinologie, Endokrinologický ústav, Praha

Alzheimerova demence (AD) má přímou souvislost s diabetem 2. typu (DM2). DM2 je rizikovým faktorem vaskulární demence, tj. degenerativních změn cévního systému mozku popisovaných často i u AD. U nemocných s AD dochází však zároveň k postupnému poškození nervových buněk, které pravděpodobně souvisí s inzulínovou rezistencí nervové tkáně. AD je proto někdy nazývána „diabetem mozku“.

**Cílem studie** bylo porovnat plazmatické hladiny adipokínů, inkretinů a dalších biomarkerů spojených s DM2 u pacientů s AD a u kontrolních nediabetických jedinců bez patologických změn v mozku.

**Metodika:** Do studie bylo zařazeno 38 žen (19 párů pacient - kontrola odpovídajícího věku a BMI) a 24 mužů (12 párů pacient - kontrola odpovídajícího věku a BMI). U všech bylo provedeno neuropsychologické vyšetření a magnetická rezonance hlavy k potvrzení (pacienti) či vyloučení (kontroly) neurologické diagnózy.



Multiplexovými kity *Bio-Plex ProHuman Diabetes 10-Plex Assay* byly hodnoceny lačné hormonální plazmatické hladiny vybraných parametrů (C-peptid, ghrelin, GIP, GLP-1, glukagon, inzulín, leptin, celkový PAI-1, rezistin, visfatin) a *Bio-Plex ProHuman Diabetes Adipin and Adiponectin Assays* (adipsin, adiponektin) (Bio-Rad). Dále byla měřena bazální glykémie, lipidová spektra, byly stanoveny hormony štítné žlázy, jaterní enzymy a antropometrické parametry včetně indexu adipozity (BAI).

**Výsledky:** Srovnávané skupiny nemocných a kontrol se u žen ani u mužů nelišily ve věku, BMI, obvodu pasu, břicha, WHR, indexu adipozity BAI ani v inzulínové senzitivitě měřené prostřednictvím HOMA-R. Ve skupině žen měly pacientky s AD ve srovnání s kontrolami významně vyšší koncentraci visfatinu ( $p < 0,001$ ), ghrelinu ( $p = 0,03$ ), GLP1 ( $p < 0,01$ ) a glukagonu ( $p < 0,01$ ). Ve skupině mužů bylo pozorování téměř shodné, pacienti s AD měli oproti kontrolám vyšší hladiny visfatinu ( $p = 0,02$ ), ghrelinu ( $p = 0,02$ ), na hranici významnosti byla vyšší hladina GLP1 ( $p = 0,05$ ) a těsně pod hranici významnosti se pohybovala koncentrace glukagonu ( $p = 0,07$ ). U ostatních měřených hladin adipokinů a inkretinů nebyl zjištěn rozdíl mezi pacienty a kontrolami.

**Závěry:** 1) Pacienti s Alzheimerovou chorobou mají vyšší hladiny plazmatického visfatinu, ghrelinu, GLP-1 a glukagonu. 2) Plazmatický visfatin je prozánětlivý cytokin, který zvyšuje riziko poškození endotelálních buněk díky zánětu a oxidativnímu stresu. 3) Ghrelin, GLP-1 a glukagon jsou známé neuroprotektivní hormony, jejich dysregulace u AD může být způsobena buď porušenou sekrecí nebo degradací a/nebo rezistencí cílových tkání k jejich účinku.

Grantová podpora IGA MZ ČR NT/13543/4, MZ ČR 00023761.

#### POLYMORFISMUS RS10830963 GENU MTNR1B SE UPLATŇUJE V ROZVOJI GESTAČNÍHO DIABETU ČESKÝCH ŽEN

Vejšková D.<sup>1</sup>, Lukášová P.<sup>1</sup>, Vaňková M.<sup>1</sup>, Bradnová O.<sup>1</sup>, Věelák J.<sup>1</sup>, Církmanová V.<sup>1</sup>, Andělová K.<sup>2</sup>, Krejčí H.<sup>3</sup>, Bendlová B.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Oddělení molekulární endokrinologie, Endokrinologický ústav, Praha

<sup>2</sup>Ústav pro péči o matku a dítě, Praha

<sup>3</sup>Gynekologicko-porodnická klinika I. LF UK a VFN, Praha

**Úvod:** Gen MTNR1B kóduje receptor pro melatonin, hormon produkovaný šišinkou a řídící spánkový a cirkadiánní rytmus. Expres MTNR1B je známa především v mozku, ale popsána je i expres v lidských pankreatických buňkách. Recentní genetické studie svědčí o tom, že variabilita v genu *MTNR1B* je dalším z hledaných faktorů, které mají vliv na patofyziologii diabetu 2. typu (DM2) a gestačního diabetu (GDM). Nejsilnější asociací s diabetem vykazuje jednonukleotidový polymorfismus rs10830963.

**Cíl:** Porovnat zastoupení genetické varianty rs10830963 v genu MTNR1B mezi gestačními diabetičkami a kontrolním souborem žen s normální lačnou glykemií a bez anamnézy gestačního diabetu. Zhodnotit případné asociace polymorfismu s biochemickými a antropometrickými markery inzulínové senzitivity (IS) v obou skupinách žen.

**Metodika:** Do studie bylo zařazeno celkem 880 žen, 458 gestačních diabetiček s půlročním až dvouletým odstupem od porodu (věk  $34,1 \pm 6,1$  let, BMI =  $24,3 \pm 4,9$  kg/m<sup>2</sup>) a 422 kontrolních žen srovnatelného věku a BMI (věk  $34,8 \pm 15,1$  let, BMI =  $23,7 \pm 4,2$  kg/m<sup>2</sup>). Všechny účastnice byly podrobně biochemicky i antropometricky vyšetřeny a podstoupily i 3-h glukózotoleranční test (oGTT). Genotypizace probíhala za použití přístroje TaqMan (LC480, Roche), ke statistickému zhodnocení byl použit program NCSS 2004.

**Výsledky:** Srovnáním genotypového rozložení i alelických frekvencí varianty rs10830963 mezi soubory byla zjištěna významně vyšší četnost minoritní a ve vztahu k diabetu rizikové alely G u gestačních diabetiček (frekvence alely G 38,3% u GDM vs. 29,4% u kontrol;  $p < 0,001$ , síla testu 0,96; OR 1,49 s CI 95% [1,22; 1,82]  $p = 0,0001$ ).

V souboru kontrol, nikoliv však v souboru gestačních diabetiček, byl polymorfismus významně asociován s hodnotami lačné i stimulované glykémie: homozygotní nositelé alely G vykazují vyšší hladiny bazální glykémie ve srovnání s běžnými homozygoty ( $p < 0,001$ ) i ve srovnání s heterozygoty ( $p = 0,002$ ). Pokud jde o stimulované hodnoty glykémie v průběhu oGTT, asociace alely G je významná až do 90. minuty testu, poté se rozdíl mezi genotypy stírají. V hodnotách bazální ani stimulované inzulínémie nebyly mezi genotypy významné rozdíly v žádné z obou skupin. Genotypy se v žádné ze skupin významně nelišily ani v ostatních biochemických parametrech (lipidy, hormony štítné žlázy, steroidní hormony) ani v antropometrických datech (obvod pasu, břicha, boků, procento tělesného tuku).

**Závěr:** Potvrzujeme u souboru české populace asociaci alely G polymorfismu rs10830963 v genu *MTNR1B* s gestačním diabetem. Souvislost s hladinou bazální glykémie, která je v naší studii zřejmá u souboru kontrolních normoglykemických žen, není patrná u žen s anamnézou gestačního diabetu.

Grants: IGA MZ ČR NT/13544-4, IGA MZ ČR NT/13543-4, MZ ČR RVO EÚ00023761.

#### ENDOKRINOLOGIA DETÍ A DORASTU

##### ŠPECIFIKÁ STAROSTLIVOSTI O PACIENTKY S TURNEROVÝM SYNDRÓMOM

Košťalová L.<sup>1</sup>, Pribilincová Z.<sup>1</sup>, Bieliková S.<sup>2</sup>, Ferenczová J.<sup>3</sup>, Šandriková V.<sup>4</sup>

<sup>1</sup>II. dětská klinika LF UK a DFNSP, Bratislava

<sup>2</sup>Neštatná dětská endokrinologická ambulancia, Banská Bystrica

<sup>3</sup>Klinika dětí a dorastu, DFN, Košice

<sup>4</sup>Neštatná dětská endokrinologická ambulancia, Prievidza

Zvýšená starostlivost zo strany pediaterov a endokrinológov o pacientky s Turnerovým syndrómom (TS) začína v čase diagnostiky syndrómu. Pacientky s monozómiou 45X0 s klasickou symptomatológiou sa dajú zdiagnozovať už v novorodeneckom veku. V centre záujmu lekárov je zistenie vrodených chýb, najmä srdca, kedy neraz ťažkú koarktáciu aorty treba ihneď operovať. V dojčeneckom veku pacientky trpia na časté zápaly ucha a začínajú postupne retardovať v raste. Pri spomalení rastovej rýchlosti a zvýraznení rastového deficitu, pacientky dostanú liečbu rastovým hormónom. S vekom narastá výskyt autoimunitných ochorení štítnej žľazy, čo vyžaduje pravidelné monitorovanie hladín FT4, TSH, aTPO a aTg. V období puberty, zväčša podľa súčasnej výšky, pacientky začínajú s liečbou estrogénmi za účelom vývoja sekundárnych pohlavných znakov ako aj vývoja vnútorných orgánov (uterusu). Pacientky v období ukončenia sledovania u detského endokrinológa mávajú hormonálne navodený pravidelný menštruačný cyklus, ukončený rast, korigované ochorenie štítnej žľazy a pravidelne robené kardiologické vyšetrenie. Pacientky, u ktorých je v karyotype mozaika TS, sú diagnostikované v neskoršom veku, najčastejšie pre problémy s rastom alebo nástupom puberty. Autorky v práci predkladajú zhodnotenie pacientiek s TS zo 4 ambulancií detských endokrinologičiek - venujú sa veku, kedy bol TS diagnostikovaný, začiatku liečby rastovým hormónom, odozve na liečbu rastovým hormónom v prvom roku liečby ako aj konečnej výške. Porovnávajú vplyv karyotypu na výslednú konečnú výšku. V závere práce uvádzajú odporúčania pre sledovanie pacientiek s TS v dospelosti.

##### IZOLOVANÉ ZVÝŠENIE TSH U OBÉZNEHO DIEŤAŤA - ČO S TÝM?

Vitáriušová E., Bednarčíková M.

II. dětská klinika LF UK a DFNSP, Bratislava

Exogénna obezita a výskyt jej pridružených ochorení sa v posledných rokoch stávajú celosvetovým problémom hlavne v pediatrickej

ni cilové dávky 6,5-7 MBq/g u malých žláz s malou aktivitou onemocnění.

Podpořeno projektom IGA MZ ČR NT 13535-3/2012.

#### NAJČASTEJŠIE TYREOPATIE V GRAVIDITE - UNIVEZÁLNY ALEBO CIELENÝ SKRÍNING?

Harčárová L.  
Prešov

Ochorenia štítnej žľazy patria medzi najčastejšie endokrinopatie s prevažujúcim postihnutím žien. Špecifickým obdobím v živote ženy je gravidita, počas ktorej prebiehajú fyziologické hormonálne zmeny a zvýšené metabolické nároky. Tieto vedú k špecifickým zmenám funkčných parametrov a objemu štítnej žľazy. Neliečené tyreopatie počas gravidity predstavujú závažné riziko pre vývoj plodu a novorodenca, preto je dôležitá ich včasná a adekvátna liečba. V Slovenskej republike od roku 2009 prebieha skrínig tyreopatií v gravidite v rámci Odborného usmernenia MZ SR pre diagnostiku a liečbu autoimunitných ochorení štítnej žľazy u žien v období tehotenstva. Cieľom mojej práce bolo potvrdiť na menšom súbore tehotných žien prínos celoplošného skrínigu tyreopatií v gravidite oproti cielemu skrínigu.

**Kľúčové slová:** štítna žľaza, gravidita, plod, poruchy funkcie ŠŽ, skrínig

#### VARIA

#### HYPONATRÉMIA AKO RIZIKOVÝ PREDIKTOR MORTALITY HOSPITALIZOVANÝCH PACIENTOV

Šturdík I., Adamcová M., Kollerová J., Koller T., Zelinková Z., Payer J.  
V. interná klinika LF UK a UN Bratislava

**Úvod a ciele práce:** Hyponatrémia je najčastejšou elektrolytovou odchýlkou, ktorá zvyšuje morbiditu aj mortalitu pacientov, hoci nie je jasné, či je nezávislým faktorom. Cieľom našej štúdie bolo zhodnotiť vplyv hyponatrémie na mortalitu pacientov hospitalizovaných na internom oddelení a určiť jej prediktívne faktory.

**Pacienti a metódy:** Retrospektívne sme analyzovali všetkých pacientov hospitalizovaných na V. internej klinike UN Bratislava od 1. januára 2012 do 31. augusta 2012, ktorí v deň prijatia na oddelenie mali sérovú hladinu sodíka menej ako 135 mmol/l. U pacientov sme sledovali demografické údaje, pridružené ochorenia, príčiny hyponatrémie a prípadné úmrtie v nemocnici. Kontrolná skupina pozostávala z pacientov s normonatrémiou, ktorí boli hospitalizovaní v rovnakom období na našej klinike, spárovaní pomerom 1:1 podľa pohlavia, veku a pridružených ochorení. Rozdiel medzi nemocničnou mortalitou študovanej a kontrolnej skupiny sme testovali Pearsonovým testom. Základná demografia, pridružené choroby, príčiny hyponatrémie a úspešnosť v korekcii hyponatrémie boli testované multivariantnou analýzou ako možné rizikové faktory mortality asociované s hyponatrémiou.

**Výsledky:** Celkovo bolo v danom období hospitalizovaných na našom oddelení 2171 pacientov Hyponatrémiu sme zistili u 278 (13%) pacientov (160 žien a 118 mužov). Najčastejšie príčiny hyponatrémie boli straty pri ochoreniach gastrointestinálneho traktu (52 pacientov), znížený perorálny príjem tekutín a potravy (47 pacientov) a dilučná príčina (45 pacientov). Mortalita hospitalizovaných pacientov s hyponatrémiou bola v porovnaní s kontrolnou skupinou štatisticky významne vyššia (22% vs. 7%, respektívne; OR 3.75, 95% CI 2.17-6.48,  $p < 0,0001$ ). Multivariantnou analýzou sme dokázali, že vek nad 65 rokov, neúspešná korekcia hyponatrémie, dilúcia a znížený perorálny príjem ako príčiny hyponatrémie sú nezávislými faktormi zvýšenej mortality.

**Záver:** Hyponatrémia je nezávislým faktorom mortality u hospitalizovaných pacientov. Vek nad 65 rokov, nedostatočná korekcia hyponatrémie a niektoré špecifické etiologické faktory hyponatrémie zvyšujú túto mortalitu.

**Kľúčové slová:** Hyponatrémia, hospitalizácia, mortalita

**Referencie:** Sturdík I, Adamcová M, Kollerová J, Koller T, Zelinková Z, Payer J. Hyponatremia is an independent predictor of in-hospital mortality. Eur J Intern Med 2014 Apr; 25(4): 379-382.

#### ODPOVEĎ KATECHOLAMÍNOV NA STROOPOV TEST U MLADÝCH PACIENTOV S HYPERTENZIOU

Penesová A.<sup>1</sup>, Garařová A.<sup>1</sup>, Čížmarová E.<sup>2</sup>, Holúbková A.<sup>1,3</sup>, Vlček M.<sup>1,3</sup>, Imrich R.<sup>1,3</sup>, Jeřová D.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Ústav experimentálnej endokrinológie, Slovenská akadémia vied, Bratislava

<sup>2</sup>Kardiologická ambulancia pre deti a dorast, Karlova Ves, Bratislava

<sup>3</sup>Molekulárno - medicínske centrum, Slovenská akadémia vied, Bratislava

Dysfunkciu autonómneho nervového systému (ANS) zohráva významnú úlohu v patogeneze hypertenzie i obezity. Cieľom našej štúdie bolo sledovanie kardiovaskulárnej odpovede a odpovede katecholamínov na mentálny stres u mladých pacientov so začínajúcou hypertenziou (HT) a BMI < 25 kg/m<sup>2</sup> (HT); u pacientov so začínajúcou HT a BMI ≥ 30 kg/m<sup>2</sup> (HT OB); u obéznych inak zdravých jedincov (OB), v porovnaní so zdravými normotenznými kontrolami s BMI < 25 kg/m<sup>2</sup> (K) podobného veku.

**Metódy:** Vyšetované osoby podstúpili mentálny stresový podnet (Stroopov test), počas ktorého sa hodnotila aktivita ANS meraním tlaku krvi (TK) a pulzovej frekvencie, variability srdcovej frekvencie (HRV) a hladín katecholamínov vo venóznej krvi.

**Výsledky:** Všetky sledované osoby reagovali na stresový podnet zvýšením systolického TK (STK;  $p = 0,0001$ ), avšak vzostup STK bol najnižší u jedincov z OB skupiny ( $p < 0,05$ ). Táto zmena STK negatívne korelovala s BMI ( $r = 0,311$ ;  $p = 0,04$ ). Pacienti s HT mali zvýšené koncentrácie adrenalínu za bazálnych podmienok (t.j. v kľude;  $p = 0,006$ ), a najvyššiu odpoveď adrenalínu a noradrenalínu počas mentálneho testu v porovnaní s kontrolami ( $p < 0,05$ ). Nezaznamenali sme štatisticky významné zvýšenie frekvencie srdca počas Stroopovho testu u žiadnej sledovanej skupiny, aj keď HT pacienti mali vyššie hodnoty pred aj počas testu. Parametre HRV neboli štatisticky významne zmenené počas mentálneho stresu u ani jednej skupiny.

**Záver:** Mladí pacienti s HT s obezitou alebo bez nej vykazujú zvýšenú sympatoadrenálnu reaktivitu na mentálny stresový podnet. Obézni inak zdraví jedinci majú tendenciu k vyššiemu normálnemu TK v pokoji, okrem toho reagovali najnižším vzostupom STK a adrenalínu v porovnaní s ostatnými skupinami. Otázkou zostáva či to môže zohrávať patogenetickú úlohu pri vzniku a rozvoji obezity. Zvýšená sympatoadrenálna reaktivita na mentálny stres predstavuje riziko rozvoja kardiovaskulárnych ochorení v neskoršom veku.

Podporené grantom APVV-0028-10.

#### PREDIKTIVITA CIRKULUJÍCICH STEROIDŮ V DIAGNOSTICE ALZHEIMEROVY NEMOCI

Vaňková M., Větelák J., Vejražková D., Lukášová P., Bradnová O., Vadinová G., Bendlová B., Hilla M.

Oddělení molekulární endokrinologie, Endokrinologický ústav, Praha

Alzheimerova choroba (AD) je neurodegeneratívni onemocnění, které se projevuje progresivní ztrátou kognitivních funkcí. Steroidy vykazují významné změny u pacientů s AD a to jak v CNS tak i v periférii, nicméně kauzální vztah ke vzniku a rozvoji onemocnění není dosud zcela objasněný.

**Cílem práce** je nalezení predikčního modelu pro klasifikaci pacientů s AD pro obě pohlaví proti věkově odpovídajícím kontrolám na základě hladin cirkulujících steroidů a jejich polárních konjugátů (sulfáty + glukuronidy).

**Metodika:** Celkem bylo vyšetřeno 52 žen ve věku 72,3 (64,0; 76,7) let (vyjádřeno jako medián s kvartily), z toho 22 kontrol a 30 pacientek s AD a 29 mužů ve věku 71,5 (66,5; 76,6) let, z toho 11 kontrol a 18 pacientů. U všech bylo provedeno neuropsychologické vyšetření a magnetická rezonance hlavy k potvrzení (pacienti) či vyloučení (kontroly) neurologické diagnózy.

Bylo stanoveno 50 steroidů a jejich polárních konjugátů (GC-MS), dále byly vyšetřeny parametry glukózového a lipidového metabolismu. Data byla zpracována vícerozměrnou regresí s redukcí dimenzionality (metoda ortogonálních projekcí do latentní struktury - O2PLS, software SIMCA v. 12.0).

Jako závisle proměnné byly zvoleny, s ohledem na pohlavní rozdíly ve hladinách steroidů, pohlaví a dále status (kontrola vs. AD). Jako nezávisle proměnné byly zvoleny hladiny steroidů, jejich polárních konjugátů a dalších laboratorních, antropometrických a klinických ukazatelů, z nichž byly na základě statistického kritéria VIP (variable importance) vybrány jen relevantní parametry. Data byla následně podrobena analýze s využitím modelu O2PLS.

**Výsledky:** Z analýzy vyplynuly 2 relevantní vzájemně nezávislé prediktivní komponenty obsahující variabilitu sdílenou mezi závisle a nezávisle proměnnými, z nichž první (PC1) byla interpretována, jako Komponenta pohlaví. Tato komponenta vysvětlovala 45,9 (41,4) % celkové variability závisle proměnných (v závorce je hodnota po cross-validaci). Druhá komponenta (PC2) byla interpretována jako Komponenta Alzheimerovy choroby (kontroly = 0, pacienti = 1). Tato komponenta vysvětlovala 35,0 (28,1) % celkové variability závisle proměnných. Komponenty byly faktorově čisté tj. první závisle proměnná korelovala s PC1 a téměř nekorelovala s PC2 a druhá závisle proměnná korelovala s PC2 a téměř nekorelovala s PC1. Model O2PLS klasifikoval s absolutní predikční účinností pohlaví (nulový překryv, senzitivita = 1; specifita = 1) a s velmi vysokou účinností přítomnost AD (chybná klasifikace 4 subjekty z 81, senzitivita = 0,938; specifita = 0,970).

**Závěr:** AD pozitivně korelovala s věkem, skupinou C21 Δ5-steroidů (pregnenolon, pregnenolonsulfát, 16α-hydroxypregnenolon) dále s 16α-hydroxy-DHEAS, skupinou Δ4-steroidů (progesteron, 17-hydroxyprogesteron, 16α-hydroxyprogesteron, androstendion), skupinou 5β-redukovaných metabolitů progesteronu (volný i konjugovaný pregnanolon, konjugovaný 5β-pregnan-3α, 20α-diol), kortizolem a SHBG. Negativně pak AD korelovala s HbA1c, 5α-redukovanými polárními konjugáty C19 17-oxo steroidů (androsteron, epiandrosteron), volným i konjugovaným 5α-androstan-3β, 17β-diolem, s hladinou fT3 (odráží aktivitu štítné žlázy) a s poměrem fT3/fT4 (odráží aktivitu dejdáz), s tukovou hmotou, HDL cholesterolem, hodnotami jaterních testů ALT a AST, a vitamínem D.

Grantová podpora IGA MZ ČR NT13543-4, MZ ČR 00023761.

#### NEUROENDOKRINNÍ NÁDORY - DIAGNOSTIKA A LÉČBA

Švebišová H.<sup>1</sup>, Koranda P.<sup>2</sup>, Fryšák Z.<sup>3</sup>, Stašek M.<sup>4</sup>, Vitásková D.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Onkologická klinika Fakultní nemocnice Olomouc

<sup>2</sup> Klinika nukleární medicíny Fakultní nemocnice Olomouc

<sup>3</sup> III. Interní klinika Fakultní nemocnice Olomouc

<sup>4</sup> I. Chirurgická klinika Fakultní nemocnice Olomouc

**Úvod:** Neuroendokrinní nádory jsou relativně novou histopatologickou diagnózou. Jsou řazeny ke vzácným onemocněním. Přes zlepšování vyšetřovacích postupů na poli nukleární medicíny a endokrinologie může být uzavření této diagnózy a naplánování léčby problém.

**Metody a výsledky:** Zhodnotili jsme soubor nemocných s neuroendokrinními nádory v KOC Olomouc od roku 2008. Z celého souboru jsme vybrali nemocné, na jejichž případech demonstruje-

me obtížnost diagnostiky těchto typů nádorů. Úspěšná léčba těchto nemocných je i výsledkem kvalitně stanovené diagnózy a dobré mezioborové spolupráce.

**Závěry:** Přínosem tohoto sdělení je zdůraznit význam mezioborové spolupráce při zjišťování a následném léčení neuroendokrinních nádorů.

**Klíčová slova:** Neuroendokrinní nádory, mezioborová spolupráce, kazuistiky

**Background:** Neuroendocrine tumors are relatively new histopathological diagnosis. They arranged for a rare disease. Despite the improvement of investigative procedures in the field of nuclear medicine and endocrinology may be the conclusion of the diagnosis and treatment planning problem.

**Methods and Results:** We evaluated a group of patients with neuroendocrine tumors in KOC Olomouc since 2008. From the entire group, we selected patients, whose cases demonstrate the difficulty of diagnosing these types of tumors. Successful treatment of these patients is the result of a successful diagnosis and good interdisciplinary cooperation

**Conclusions:** The benefit of this communication is to emphasize the importance of interdisciplinary collaboration in the identification and subsequent treatment of neuroendocrine tumors.

**Key words:** Neuroendocrine tumors, interdisciplinary collaboration, case reports

#### ŠTÍTNÁ ŽLÁZA III

#### ELASTOGRAFIE V DIAGNOSTICE TYREOIDÁLNÍCH UZLŮ - PRVNÍ VÝSLEDKY V ČESKÉ REPUBLICE

Jiskra J., Krátký J.

3. Interní klinika I. LF UK a VFN, Praha

**Úvod:** Elastosonografie byla vyvinuta Ophirem et al. v r. 1991<sup>(1)</sup>. Principem je stanovení stlačitelnosti vyšetřované tkáně s předpokladem, že pravděpodobnost malignity je vyšší v tužších lézích. Existují dva elastografické principy: „strain“ elastografie (SE) a elastografie rázovou vlnou („shear wave“), se kterou je dosud málo zkušeností<sup>(2)</sup>. Při SE dochází při stlačování k rozdílné kompresi jednotlivých tkání (uzel vs. okolní tkáň), která je přímo úměrná elasticitě tkáně. Rozdíl rychlosti pohybů tkání vůči sondě je snímán pomocí tkáňové dopplerovské sonografie. Hodnocení může být kvalitativní jako elastografické skóre (obvykle 1-5, 1 - nejměkčí, 5 - nejužší) nebo kvantitativní jako poměr elasticity vyšetřované tkáně (uzlu) vůči okolí. Starší klinické studie dosahovaly u tyreoidálních uzlů senzitivity 80-97 % a specifity 79-100 % v detekci malignity<sup>(3,4)</sup>. Dvě recentní práce<sup>(3,4)</sup> potvrdily vysokou negativní prediktivní hodnotu SE (99,1 % resp. 97,2 %).

**Metody:** Do pilotní studie bylo zařazeno 35 uzlů od 35 pacientů, z toho 10 karcinomů (9 papilárních a 1 folikulární) a 25 benigních uzlů (13 histologicky verifikovaných a 12 s benigní FNAC a nejméně 3 roky stabilním USG nálezem). Přístrojem Logiq GE byla u každého uzlu provedena strain elastografie, která se hodnotila kvantitativně (elastografické skóre 1-5) a kvalitativně jako strain/ratio [poměr elasticity uzlu k okolnímu parenchymu štítné žlázy (SR-T), karotidě (SR-C) a krčnímu svalu SR-M)].

**Výsledky:** Medián SR-T byl 2,65 u karcinomů a 1,05 u benigních uzlů (P = 0,005), medián SR-C byl 0,88 u karcinomů a 0,5 u benigních uzlů (P = 0,002) a medián SR-M byl 1,15 u karcinomů a 0,7 u benigních uzlů (0,009).

**Závěr:** Výsledky ukázaly, že při hodnocení tuhosti tyreoidálních uzlů jako poměr stlačitelnosti vůči okolním strukturám byly karcinomy štítné žlázy významně tužší oproti benigním uzlům. Vysoká negativní prediktivní hodnota elastografie činí tuto metodu perspektivní ke snížení počtu uzlů indikovaných k punkci, event. snížení počtu operací u pacientů s neurčitým výsledkem cytologie. Potenciální

# Endocrine Abstracts

May 2015 Volume 37  
ISSN 1479-6848 (online)

17th European Congress of  
Endocrinology 2015

16-20 May 2015, Dublin, Ireland



Chimeric somatostatin (SST)/dopamine (DA) compounds, termed dopastatins, such as BIM-23A760, an agonist for SST (sst2 and sst5) and DA (D2) receptors, are emerging as promising new approaches to treat pituitary adenomas. However, their actions and mechanisms on the different types of pituitary tumours are still incompletely understood. Thus, the aim of this study was to analyse a set of key functional parameters (signaling pathways, hormonal expression and secretion, cell viability, and apoptosis), in response to BIM-23A760 in a series of 74 human pituitary tumours: 22 somatotropinomas, five mixed GH/PRL-secreting adenomas, 11 corticotropinomas, 26 NFPAs, six prolactinomas, one FSH-secreting gonadotropinoma and three TSH-omas; and in five normal human pituitaries and pituitary samples derived from three female olive baboons (*Papio anubis*). Although, BIM-23A760 has recently been withdrawn from clinical development after finding that a dopaminergic metabolite accumulates and interferes with the activity of the parent compound *in vivo*, it is still considered a good prototype molecule for dopastatins, and the results generated herein might be indeed useful in understanding and predicting the response to this type of compounds, which may be used for clinical purposes in the future. Our results demonstrate that BIM-23A760 differentially impacted all functional parameters analysed, with most responses being clearly inhibitory for cell signalling, hormone secretion and cell survival. Yet, interestingly, certain pituitary adenomas displayed distinct, even opposite responses to BIM-23A760 (i.e. paradoxical stimulatory responses), which were associated with the relative expression levels of SST- and DA-receptors. In particular, alterations on the expression of sst5 and its truncated variant, sst5TMD4, might represent potential molecular signatures contributing to the differential, inhibitory/stimulatory response to BIM-23A760 in GH- and ACTH-secreting adenomas. Altogether, our results reinforce the notion that chimeric dopastatins (e.g. BIM-23A760) can affect multiple, clinically relevant parameters on most types of pituitary adenomas and may represent new therapeutic tools to treat pituitary tumours, wherein the relative SST/DA receptor expression profile might provide useful molecular markers to predict the ultimate response of these tumours to BIM-23A760.

#### Disclosure

This work was supported by Junta de Andalucía (CTS-1406, BIO-0139, PI-0639-2012) Ministerio de Economía y Competitividad, Gobierno de España (BFU2013-43282-R), Instituto de Salud Carlos III (PI13/00651), Centro de Investigación Biomédica en Red de la Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (CIBERObn) and Ayuda Merck Serono 2013. M D Culler is an employee of IPSEN.  
DOI: 10.1530/endoabs.GP.17.09

## Pituitary – Basic and IGF-1

### GP.18.01

#### Chronic stress decreases circulating endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol in healthy human subjects

Buqing Yi<sup>1</sup>, Igor Nichiporuk<sup>2</sup>, Matthias Feurecker<sup>1</sup>, Gustav Schelling<sup>1</sup> & Alexander Choukèr<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Hospital of the University of Munich (LMU), Munich, Germany; <sup>2</sup>Institute for Biomedical Problems, Moscow, Russia.

Increasing evidence indicates chronic stress plays an important role in a variety of health problems such as the development of autoimmune disease, and the results from mice studies suggest that the central endocannabinoid (eCB) system regulates endocrine and neuronal responses to stress. However, it is unclear how the eCB system responds to chronic stress in healthy humans. A 520-day isolation-and-confinement study simulating an interplanetary spaceflight mission to Mars provided an extraordinary chance to study the effects of chronic stress imposed by prolonged isolation. Six healthy males participated in this mission and stayed in the simulated spacecraft for 520 days. The current study aimed to investigate the effects of chronic stress on circulating concentrations of eCBs in these healthy subjects. Blood samples for eCBs measurements were obtained before and at regular intervals during the isolation period. Salivary samples were taken for cortisol assay. 24 h urine samples were collected for catecholamines measurements. Blood concentrations of the eCBs, N-arachidonylethanolamine (anandamide, AEA) and 2-arachidonoylglycerol (2-AG), were determined.

Compared with the baseline level, stress hormone cortisol levels and urine norepinephrine secretions were significantly increased during the isolation period, indicating a stressed condition. Interestingly, stress decreased blood concentrations of 2-AG, but not AEA. Furthermore, 2-AG concentrations were negatively correlated with salivary cortisol levels. These results indicate that chronic stress decreases circulating 2-AG in healthy human subjects, suggesting dysregulation of 2-AG signalling is specifically implicated in humans under chronic stress.

#### Disclosure

This study was supported by grants from the German Ministry of Technology and Economics (BMW) as handled by DLR (grant numbers 50WB0919 and 50WB1317).

DOI: 10.1530/endoabs.GP.18.01

### GP.18.02

#### Neuroactive steroids as predictive markers for Alzheimer's disease

Marketa Vankova<sup>1</sup>, Daniela Vezrazkova<sup>1</sup>, Petra Lukasova<sup>1</sup>, Olga Bradnova<sup>1</sup>, Gabriela Vacinova<sup>1</sup>, Katerina Dvorakova<sup>1</sup>, Martin Hill<sup>1</sup>, Josef Vcelak<sup>1</sup>, Robert Rusina<sup>2</sup>, Iva Holmerova<sup>3</sup> & Bela Bendlova<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>Institute of Endocrinology, Prague, Czech Republic; <sup>2</sup>Thomayer Hospital, Prague, Czech Republic; <sup>3</sup>Faculty of Humanities, Charles University, Prague, Czech Republic.

#### Background and aims

Neuroactive steroids and their metabolites play an important regulatory role in the nervous system affecting the neuronal plasticity, stress response, learning, and memory. The aim of the study was to compare the steroid metabolome in AD patients and controls.

#### Materials and methods

The study comprised of 48 AD patients (30 women and 18 men; age 73.8 ± 9.54 years) and 33 matched controls (22 women and 11 men; age 68.2 ± 5.94 years). All subjects underwent neuropsychological examination and magnetic resonance imaging of the brain. Biochemical characterisation included examination of fasting glucose and lipid metabolism and the determination of extended spectrum of steroid hormones by GC-MS method (38 steroids and their sulfates). Statistical analyzes were performed using Statgraphics Centurion XVI 16.0.07 Software.

#### Results

AD patients had significantly higher insulin secretion (fasting insulin, HOMA<sub>F</sub>) and lower C peptide/insulin ratio compared to controls which indicates the decreased hepatic insulin extraction. AD patients had higher C21 steroids (5β-pregnane-3α, 20α-diol conjugate, women in addition pregnenolone, 16α-hydroxy-pregnenolone, 16α-hydroxy-progesterone, men in addition 16α-hydroxy-DHEA, and pregnanolone) and lower C19 steroids (5α-androstan-3β, 17β-diol conjugate, women in addition conjugates of androsterone, epiandrosterone, epietiocholanolone, and 5β-androstan-3β, 17β-diol) compared to controls. Neither in AD nor in controls a direct relationship of steroids with fasting glucose, insulin and HOMAR was found.

#### Conclusion

C21 steroid levels were consistently higher in AD, suggesting an increased activity of the zona fasciculata of adrenal gland. Conversely, levels of stable 5α/β reduced catabolites of C19 steroids, particularly their sulfates, are consistently reduced in AD (unlike insignificantly different unreduced androgenic precursors showing a diurnal variation). This indicates a decrease in the activity of the adrenal zona reticularis in AD. AD patients have higher levels of insulin in the periphery, however, the direct relationship between glucose tolerance and steroid metabolome was not confirmed.

#### Disclosure

This work was supported by grant IGA MH CR NT13543-4, MH CR 00023761.

DOI: 10.1530/endoabs.GP.18.02

# Neuroactive steroids as predictive markers for Alzheimer's disease

B. Bendlová<sup>1</sup>, M. Hill<sup>1</sup>, J. Včelák<sup>1</sup>, D. Vejražková<sup>1</sup>, P. Lukášová<sup>1</sup>, G. Vacinová<sup>1</sup>, O. Bradnová<sup>1</sup>, K. Dvořáková<sup>1</sup>, R. Rusina<sup>1</sup>, I. Holmerová<sup>2</sup>, M. Vaňková<sup>3</sup>  
<sup>1</sup>Institute of Endocrinology, Prague; <sup>2</sup>Thomayer Hospital, Prague; <sup>3</sup>Faculty of Humanities, Charles University, Prague

Many studies have demonstrated a link between Alzheimer's disease (AD) and type 2 diabetes (T2D), but the connection underlying this relationship is not completely clear. Diabetic pathologies may lead to both AD and vascular damage. Neuroactive steroids and their metabolites play an important regulatory role in the nervous system affecting the neuronal plasticity, stress response, learning and memory.

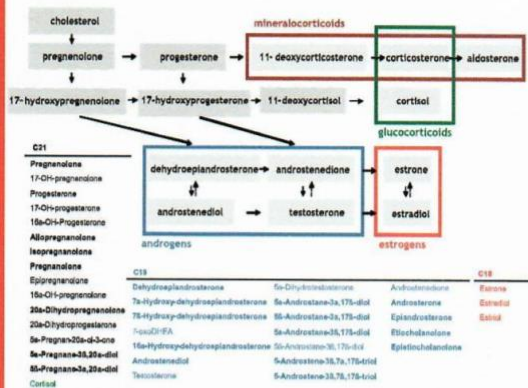
The aim of the study was to compare the steroid metabolome in AD patients and controls, to evaluate its possible relation to glucose metabolism and to propose the predictive model for AD.

## Subjects:

	AD (n=48)	Controls (n=33)
Men / Women	18 / 30	11 / 22
Age (years)	72.3 ± 10.42 / 74.4 ± 9.1	69.6 ± 4.44 / 67.5 ± 6.55
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	26.3 ± 3.61 / 25.7 ± 4.08	27.6 ± 3.28 / 27.9 ± 5.71

## Methods:

- Neuropsychological examination and brain MRI for exclusion/confirmation of neurological diagnosis
- Glucose and lipid metabolism, anthropometric examination
- Extended spectrum of steroid hormones (GC-MS): 38 steroids + their conjugates
- Statistical software NCSS 2004, Statgraphics Centurion XVI 16.0.07, SIMCA-P
- Kruskal-Wallis One-Way ANOVA on Ranks, multivariate regression with reduction of dimensionality (O2PLS), predictive model for AD
- Patients taking corticosteroids, fluoxetine (an inhibitor of serotonin uptake), HRT, estrogens, NSAIDs were excluded



## Conclusions:

AD patients have higher levels of insulin in the periphery, however, the direct relationship between glucose tolerance and steroid metabolome was not confirmed.

C21 steroid levels were consistently higher in AD, suggesting an increased activity of the zona fasciculata of adrenal gland.

Conversely, levels of stable 5α/β reduced catabolites of C19 steroids, particularly their sulfates, are consistently reduced in AD (unlike insignificantly different unreduced androgenic precursors showing a diurnal variation). This indicates a decrease in the activity of the adrenal zona reticularis in AD.

## Results:

Glucose metabolism	AD (n=32)	Controls (n=14)	p*
Normal glucose tolerance			
HbA1c [mmol/mol]	37.5 ± 2.48	37.7 ± 3.38	0.09
glycaemia [mmol/l]	4.9 ± 0.21	5.2 ± 0.22	0.001
proinsulin [mmol/l]	3.9 ± 4.66	2.2 ± 2.1	0.09
insulin [mIU/l]	10.1 ± 4.61	7.2 ± 3.23	0.02
C-peptide [nmol/l]	0.8 ± 0.02	0.7 ± 0.23	0.28
HOMAF	149 ± 60.9	84 ± 36.2	0.0007
HOMAR	2.2 ± 1.07	1.6 ± 0.78	0.09

Mean ± SD, Kruskal-Wallis One-Way ANOVA on Ranks (NCSS 2004)

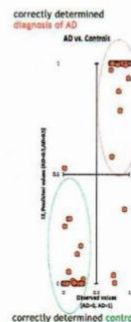
Impaired glucose tolerance	AD (n=16)	Controls (n=19)	p*
HbA1c [mmol/mol]	39.8 ± 2.92	37.3 ± 5.3	0.28
glycaemia [mmol/l]	5.9 ± 2.28	6 ± 0.37	0.36
proinsulin [mmol/l]	5.9 ± 2.3	5.9 ± 4.82	0.99
insulin [mIU/l]	17 ± 6.14	12.3 ± 5.24	0.09
C-peptide [nmol/l]	1.3 ± 0.49	1 ± 0.29	0.13
HOMAF	145 ± 52.6	99 ± 42.42	0.05
HOMAR	4.4 ± 1.63	3.3 ± 1.47	0.14

## Steroids

Women	AD (n=30)	Controls (n=22)	p*
Pregnenolone	1.6 ± 1.38	0.9 ± 0.48	0.03
16α-hydroxy-pregnenolone	0.2 ± 0.15	0.1 ± 0.11	0.02
16α-hydroxy-progesterone	0.7 ± 0.54	0.5 ± 0.72	0.02
5β-Pregnan-3α,20α-diol C	13.5 ± 7.15	8.6 ± 3.71	0.005
Androsterone C	220.2 ± 201.1	403.5 ± 227.87	0.001
Epiandrosterone C	77.6 ± 55.23	152.2 ± 85.52	0.001
Epietiocholanolone C	8.9 ± 7.26	16.5 ± 11.55	0.003
5α-Androstan-3β,17β-diol C	15.9 ± 11.61	48.4 ± 44.71	0.0001
5β-Androstan-3β,17β-diol C	3.3 ± 1.88	4.6 ± 2.35	0.049

Men	AD (n=18)	Controls (n=11)	p*
Pregnenolone	0.07 ± 0.034	0.04 ± 0.030	0.01
5β-Pregnan-3α,20α-diol C	22.9 ± 13.21	10.8 ± 4.17	0.006
16α-hydroxy-dehydroepiandrosterone	0.06 ± 0.0444	0.03 ± 0.026	0.03
5α-Androstan-3β,17β-diol C	81.1 ± 56.82	137.4 ± 61.54	0.02

Mean ± SD, Kruskal-Wallis One-Way ANOVA on Ranks (NCSS 2004); C conjugated forms [nmol/l]



## Prediction vs. observation

Confidence intervals for sensitivity, specificity, two-level likelihood ratios and diagnostic odds ratio

Sensitivity	0.9375	CI: 0.675 to 1.188
Specificity	0.9697	CI: 0.421 to 0.579
Positive likelihood ratio	30.937	CI: 7.806 to 122.608
Negative likelihood ratio	0.064	CI: 0.048 to 0.086
Diagnostic odds ratio	480	CI: 47.73 to 4826.57

Supported by grants IGA MH CZ NT/13543/4, NT/13544/4, MH CZ 00023761. Contact: bbendlova@endo.cz

# DIABETOLOGIE METABOLISMUS ENDOKRINOLOGIE VÝŽIVA

ČASOPIS PRO POSTGRADUÁLNÍ VZDĚLÁVÁNÍ

ROČNÍK 17 • SUPPLEMENTUM 1 • 2014

L. DIABETOLOGICKÉ DNY  
Luhačovice, 10.–12. dubna 2014

ABSTRAKTA

INDEXOVÁNO V EMBASE - EXCERPTA MEDICA  
EXCERPOVÁNO V BIBLIOGRAPHIA MEDICA CECOSLOVACA

[www.tigis.cz](http://www.tigis.cz)

ISSN 1571-9395

**TIGIS**

## BILATERÁLNÍ OVAREKTOMIE MŮŽE NEPŘÍZNIVĚ OVLIVNIT SACHARIDOVÝ METABOLISMUS VE SROVNÁNÍ S PŘIROZENÝM PRŮBĚHEM MENOPAUY

Lejsková M.<sup>1,3</sup>, Piřha J.<sup>2</sup>, Adámková S.<sup>2</sup>, Auzký O.<sup>2</sup>, Adámek T.<sup>1</sup>, Babková E.<sup>1</sup>, Alušík Š.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Interní oddělení TN, Praha

<sup>2</sup>IKEM Praha

<sup>3</sup>IPVZ Praha

**Úvod:** Výskyt diabetu celosvětově prudce stoupá. Ke klíčovému momentům při rozvoji diabetu 2. typu patří porucha funkce beta-buněk pankreatu. Beta-buněk mají několik typů estrogenových receptorů, které mohou napomáhat, aby fyziologicky kolísající hladiny estrogenů hrály roli v ochraně beta-buněk při zvýšených nárocích na sekreci inzulinu. V prospektivní šestileté epidemiologické studii jsme sledovali změny funkce beta-buněk parametrem HOMA-B =  $20 \times \text{lačný inzulin} / (\text{lačná glukóza} - 3,5)$  během přirozené i umělé menopauzy. V předchozí analýze (Luhačovice 2012) jsme ukázali rychle stoupající výskyt (pre)diabetu kolem přirozené menopauzy a vztah zhoršení funkce beta-buněk k míře premenopauzální manifestace metabolického syndromu. Cílem této práce bylo sledovat parametry sacharidového metabolismu v podskupině žen, které prodělaly před vstupem bilaterální ovariectomie.

**Metodika:** Mezi 606 opakovaně vyšetřenými ženami s věkem vstupu 45–55 let, bylo postupně vyčleněno šest skupin žen: ženy s hormonální terapií (HR, n = 92), ženy po bilaterální ovariectomii (OO, n = 43), po hysterektomii (HY, n = 64); zbyváající skupina s přirozeným průběhem období kolem menopauzy (NAT, n = 387) byla rozdělena na 3 skupiny podle menopauzálního statusu při vstupu: premenopauzální (PRE, n = 252), perimenopauzální (PERI, n = 43), postmenopauzální (POST, n = 92). Při vstupu a po 6 letech byly stanoveny potřebné parametry včetně inzulinémie, HOMA-B. Ke statistickému hodnocení byl užít t-test.

**Výsledky:** Během 6 let stoupl výrazně výskyt prediabetických+diabetických hodnot lačné glykémie (PRE 17 % → 28 %; PERI 21 % → 28 %; POST 25 % → 40 %; HR 18 % → 26 %; HY 15 % → 34 %; OO 21 % → 38 %). Výskyt diabetických hodnot stoupl celkově na trojnásobek (1,2 % → 3,6 %), nejvýrazněji ve skupině POST (2,2 % → 6,5 %), ale nejčastější byl mezi OO (7,0 % → 9,5 %). Přitom OO ženy bez diabetu měly průměrný šestiletý nárůst glykémie 0,43 mmol/L – vyšší než NAT (p < 0,01) i než POST (p < 0,05). Rovněž u dalších parametrů metabolického syndromu byly šestileté změny méně příznivé u OO než u NAT; významnosti (p < 0,05) však dosáhl pouze šestiletý pokles HDL-C, růst celkového cholesterolu i HOMA-IR, nikoliv však změny BMI, hladiny inzulinu ani dalších sledovaných parametrů MS. Funkce beta-buněk podle parametru HOMA-B po 6 letech, nikoliv její zhoršení, byla u OO významně nižší pouze při započítání žen s diabetem, ale po jejich vyřazení se průměr OO nelišil od ostatních skupin.

**Závěr:** Bilaterální ovariectomie může nepříznivě ovlivnit sacharidový metabolismus ve srovnání s přirozeným průběhem menopauzy.

Studie byla podpořena grantem NS10511-3/2009 IGA MZCR.

## VZTAH NEUROAKTIVNÍCH STEROIDŮ A GLUKÓZOVÉ TOLERANCE U PACIENTŮ S ALZHEIMEROVOU CHOROBOU A ZDRAVÝCH SENIORŮ

Vaňková M., Vejražková D., Lukášová P., Bradnová O., Vacínová G., Dvořáková K., Hill M., Včelák J., Bendlová B.  
Endokrinologický ústav, Praha

**Úvod:** Alzheimerova choroba (AD) je neurodegenerativní onemocnění, které se projevuje progresivní ztrátou kognitivních funkcí. Neuroaktivní steroidy a jejich metabolity mají důležitou regulační úlohu v nervovém systému, ovlivňují plasticitu neuronů, odpověď na stres, učení a paměť a mají neuroprotektivní účinek. U AD jsou popisovány změny v hladinách neuroaktivních steroidů, ale kauzální vztah ke vzniku a rozvoji onemocnění není dosud zcela objasněn. Dalším ne zcela jasným rizikovým faktorem pro AD je porušená glukózová tolerance a diabetes 2. typu. Naše pilotní studie prokázala vliv glukózového tolerančního testu na hladiny některých neuroaktivních steroidů.

**Cílem studie** bylo porovnat steroidní metabolom 1) u pacientů s AD a věkově odpovídajících kontrol a 2) ve vztahu ke glukózové toleranci.

**Metodika:** Vyšetřeno bylo 48 pacientů s AD (30 žen a 18 mužů; věk  $73,8 \pm 9,54$  let) a 33 zdravých seniorů (22 žen a 11 mužů; věk  $68,2 \pm 5,94$  let). U všech bylo provedeno neuropsychologické vyšetření a magnetická rezonance hlavy k potvrzení (pacienti) či vyloučení (kontroly) neurologické diagnózy. Biochemická charakterizace zahrnovala vyšetření lačného glukózového a lipidového metabolismu a stanovení rozšířeného spektra steroidních hormonů (GC-MS).

**Výsledky:** Ve skupině pacientů s AD bylo 32 normoglykemických osob (67 %), 6 s porušenou glukózovou tolerancí (12 %) a 10 diabetiků (21 %). V kontrolní skupině bylo 14 normoglykemických osob (42 %) a 19 osob s porušenou glukózovou tolerancí (58 %).

V normoglykemické skupině měli pacienti s AD oproti kontrolám vyšší sekreci inzulinu (lačný inzulin, HOMA) a vyšší poměr inzulin/C peptid.

Pacienti s AD měli oproti kontrolám vyšší C21 steroidy (5 $\beta$ -pregnan-3 $\alpha$ ,20 $\alpha$ -diol konjugát, ženy navíc pregnenolon, 16 $\alpha$ -hydroxy-pregnenolon, 16 $\alpha$ -hydroxy-progesteron, muži navíc 16 $\alpha$ -hydroxy-dehydroepiandrosteron, pregnanolon) a nižší C19 steroidy (5 $\alpha$ -androstan-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol konjugát, ženy navíc androsteron konjugát, epiandrosteron konjugát, epietiocholanolon konjugát, 5 $\beta$ -androstan-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol konjugát).

Ve skupině AD ani u kontrol jsme nepotvrdili vliv glukózové tolerance na hladiny steroidů.

**Závěr:** Hladiny C21 steroidů byly konzistentně vyšší u AD, což ukazuje na zvýšenou činnost *zona fasciculata* nadledviny. Naopak hladiny stabilních 5 $\alpha$ / $\beta$  redukováných katabolitů C19 steroidů, zvláště jejich sulfátů, jsou konzistentně sníženy u AD (na rozdíl od nevýznamně rozdílných neredukovaných androgenních prekurzorů vykazujících diurnální variace). To ukazuje na sníženou aktivitu *zona reticularis* nadledviny u AD. Vztah glukózové tolerance se steroidním metabolomem jsme neprokázali.

IGA MZ ČR NT13543-4, MZ ČR 00023761.



# DIABETOLOGIE METABOLISMUS ENDOKRINOLOGIE VÝŽIVA

ČASOPIS PRO POSTGRADUÁLNÍ VZDĚLÁVÁNÍ

ROČNÍK 18 • SUPPLEMENTUM 1 • 2015

LI. DIABETOLOGICKÉ DNY

Luhačovice, 16.–18. dubna 2015

ABSTRAKTA

INDEXOVÁNO V EMBASE - EXCERPTA MEDICA  
EXCERPOVÁNO V BIBLIOGRAPHIA MEDICA CECOSLOVACA  
ČASOPIS JE INDEXOVÁN V DATABÁZI SCOPUS

sníženým ukládáním ve tkáních. Mechanismus těchto účinků nebyl dosud objasněn. Jednou z možností pozitivního vlivu metforminu na dyslipidemii by mohlo být zvýšení aktivity hnědé tukové tkáně (HTT), která spotřebovává velké množství energetických substrátů, převážně TAG z intracelulárně uložených lipidů nebo z cirkulace. Recentní studie ukázaly, že aktivní HTT se vyskytuje i u dospělých jedinců a že její množství negativně koreluje se stupněm obezity.

*Cílem této studie* bylo zjistit, zda metformin zvyšuje aktivitu HTT a zda se společně s tím zlepšují parametry metabolického syndromu.

*Metodika:* Potkanům kmene Wistar (věk: 8 měsíců, počet zvířat ve skupině: 6) byla podávána standardní dieta (SD) bez přídavku nebo s přídavkem metforminu (300 mg metforminu/1 kg tělesné hmotnosti) po dobu 4 týdnů.

Aktivita HTT byla stanovena *ex vivo* při inkubaci tkáně 2 hod při 37 °C podle inkorporace <sup>14</sup>C-U-glukózy, resp. <sup>14</sup>C-U-palmitové kyseliny do lipidů HTT a podle oxidace <sup>14</sup>C-U-glukózy, resp. <sup>14</sup>C-U-palmitové kyseliny na CO<sub>2</sub>. Koncentrace vybraných parametrů v plazmě byly měřeny pomocí komerčně dostupných kitů: TAG (Erba-Lachema, ČR), inzulin (MercoDIA, Sweden), vysokomolekulární (HMW) adiponektin (Shibayagi Co., Japan), C-reaktivní protein (CRP) (AlphaDiagnostic, USA).

*Výsledky:* Podávání metforminu vedlo ke snížení tělesné hmotnosti (-25 %, p < 0,001) a množství epididymální a perirenální tukové tkáně, (-61 %, p < 0,002). Metformin snížil množství triacylglycerolů v plazmě (-48 %, p < 0,03) a jejich ekto-pickou akumulaci v játrech (-72 %, p < 0,02), srdci (-66 %, p < 0,03), aortě (-48 %, p < 0,01) a bránici (-80 %, p < 0,01). V HTT metformin zvýšil inkorporaci <sup>14</sup>C-U-palmitové kyseliny do lipidů (+26 %, p < 0,01) a její oxidaci měřenou podle produkce CO<sub>2</sub> (+45 %, p < 0,03). Léčba metforminem v HTT rovněž výrazně zvýšila jak bazální (+61 %, p < 0,01) tak inzulinem stimulovanou (+60 %, p < 0,01) inkorporaci <sup>14</sup>C-U-glukózy do lipidů, zatímco oxidace <sup>14</sup>C-U-glukózy nebyla metforminem ovlivněna. Metformin také snížil sérové koncentrace inzulinu (-61 %, p < 0,001), měl pozitivní vliv na koncentrace HMW adiponektinu (+43 %, p < 0,05) a snížil sérové koncentrace CRP (-53 %, p < 0,02).

*Závěr:* Výsledky ukazují, že protektivní účinky metforminu na dyslipidemii, ekto-pické ukládání lipidů a další parametry metabolického syndromu mohou být alespoň zčásti zprostředkovány zvýšenou utižitelností energetických substrátů v HTT.

*Studie byla podpořena grantem GAČR P305/13-04420S.*

#### P14

#### SPEKTRUM VOLNÝCH MASTNÝCH KYSELIN U PACIENTŮ S ALZHEIMEROVOU NEMOCÍ A U ZDRAVÝCH SENIORŮ V ZÁVISLOSTI NA PŘÍTOMNOSTI DIABETU 2. TYPU

Vacínová G.<sup>1,2</sup>, Vaňková M.<sup>1</sup>, Bradnová O.<sup>1</sup>, Vejražková D.<sup>1</sup>, Bešťák J.<sup>1</sup>, Lukášová P.<sup>1</sup>, Včelák J.<sup>1</sup>, Bendlová B.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Endokrinologický ústav, Praha

<sup>2</sup>Přírodovědecká fakulta UK, Katedra antropologie a genetiky člověka, Praha

*Úvod:* Diabetes mellitus 2. typu (DM2) je rizikovým faktorem pro Alzheimerovu nemoc (AD). Inzulinová rezistence, která je spojovaná se změněnou skladbou mastných kyselin, je významným faktorem v rozvoji DM2 i AD a může propojovat patologii obou onemocnění.

Volné mastné kyseliny jsou významným faktorem, který ovlivňuje inzulinovou senzitivitu a funkci beta-buněk pankreatu. Avšak nejen absolutní koncentrace volných mastných kyselin v séru, ale také relativní zastoupení nebo vzájemný poměr nasyčených mastných kyselin (SFA), mononenasyčených mastných kyselin (MUFA) a polynenasycených mastných kyselin (PUFA) může vypovídat o patologickém stavu.

*Cílem studie* bylo porovnat spektra volných mastných kyselin u pacientů s AD a u zdravých seniorů bez porušených kognitivních funkcí v souvislosti s přítomností či nepřítomností DM2.

*Metodika:* Celkem bylo vyšetřeno 100 jedinců, z toho 12 pacientů s AD a DM2 (4 muži a 8 žen; věk 78 ± 6,7 let), 27 pacientů s AD bez DM2 (11 mužů a 16 žen; věk 72 ± 9,6 let), 24 kontrolních seniorů s DM2 (14 mužů a 10 žen; věk 62 ± 7,9 let) a 37 seniorů bez DM2 (10 mužů a 27 žen; věk 56 ± 6,6 let). Byly stanoveny parametry lačného glukózového a lipidového metabolismu, včetně spektra volných mastných kyselin (stanoveno metodou HPLC). Statistická analýza byla provedena pomocí Kruskalova-Wallisova testu s mnohonásobným porovnáním (NCSS 2004).

*Výsledky:* Hodnota BMI je nejvyšší u diabetiků bez AD, v ostatních skupinách je podobná. BAI (body adiposity index) je srovnatelný ve všech sledovaných skupinách.

Pacienti s DM2 bez AD mají významně nižší hladinu HDL-cholesterolu a vyšší hladinu triacylglycerolů než ostatní skupiny, celkový cholesterol a LDL-cholesterol je ve všech skupinách stejný, stejně jako celková koncentrace mastných kyselin v plazmě.

Významné rozdíly jsme zjistili v procentuálním zastoupení MUFA a PUFA u pacientů s AD ve srovnání se zdravými seniory s normálními kognitivními funkcemi. Pacienti s AD měli vyšší relativní zastoupení MUFA (p < 0,001) a nižší zastoupení PUFA (p < 0,001). Poměr omega-6 mastných kyselin k omega-3 mastným kyselinám byl také významně vyšší u pacientů s AD oproti kontrolním seniorům (p < 0,001). Relativní zastoupení SFA bylo ve všech sledovaných skupinách stejné. V našem souboru jsme nezaznamenali významný vliv DM2 na složení volných mastných kyselin.

*Závěr:* V souvislosti s diabetem 2. typu jsme v našem souboru seniorů neprokázali signifikantně odlišné spektrum volných mastných kyselin mezi pacienty s diabetem 2. typu a nediabetiky, nicméně významné rozdíly jsme potvrdili v souvislosti s přítomností Alzheimerovy nemoci.

IGA MZ ČR NT/13543-4, MZ ČR 00023761.

#### P15

#### VZTAH FGF-21 A A-FABP K UKAZATELŮM INZULINOVÉ REZISTENCE A ENDOTELOVÉ DYSFUNKCE U JEDINCŮ S DYSLIPIDEMIÍ

Karásek D.<sup>1</sup>, Novotný D.<sup>2</sup>, Vaverková H.<sup>1</sup>, Orság J.<sup>1</sup>, Cibičková L.<sup>1</sup>, Gajdová J.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>III. interní klinika – nefrologie, revmatologie a endokrinologie LF UP a FN Olomouc

<sup>2</sup>Oddělení klinické biochemie FN Olomouc

*Úvod:* Fibroblastový růstový faktor 21 (FGF 21) má řadu pozitivních metabolických účinků a podle některých i ochranný vliv na kardiovaskulární buňky. Naopak adipocytární protein vázající

## Spektrum volných mastných kyselin u pacientů s Alzheimerovou nemocí a u zdravých seniorů v závislosti na přítomnosti diabetu 2. typu

Vacínová G.<sup>1,2</sup>, Vaňková M.<sup>1</sup>, Bradňová O.<sup>1</sup>, Vejražková D.<sup>1</sup>, Bešťák J.<sup>1</sup>, Lukášová P.<sup>1</sup>, Včelák J.<sup>1</sup>, Bendlová B.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Endokrinologický ústav, Praha

<sup>2</sup> Přírodovědecká fakulta UK, Katedra Antropologie a genetiky člověka, Praha

### Úvod:

Diabetes mellitus 2. typu (DM2) je rizikovým faktorem pro vznik Alzheimerovy nemoci (AD). Inzulínová rezistence, která je spojovaná se změnou skladbou mastných kyselin, je významným faktorem v rozvoji DM2 i AD a může propojovat patologii obou těchto onemocnění. Volné mastné kyseliny (FFA) jsou významným faktorem, který ovlivňuje inzulínovou senzitivitu a funkci beta buněk pankreatu. Avšak nejen absolutní koncentrace volných mastných kyselin v séru, ale také relativní zastoupení nebo vzájemný poměr nasycených mastných kyselin (SFA), mononenasycených mastných kyselin (MUFA) a polynenasycených mastných kyselin (PUFA) může vypovídat o patologickém stavu.

### Cíl:

Cílem studie bylo porovnat spektra volných mastných kyselin u pacientů s AD a u zdravých seniorů bez porušených kognitivních funkcí v souvislosti s přítomností či nepřítomností DM2.

### Soubory:

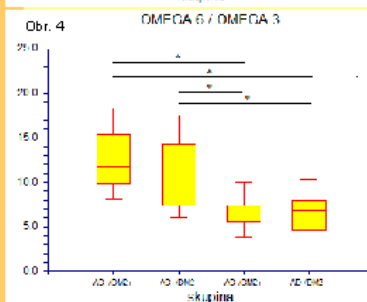
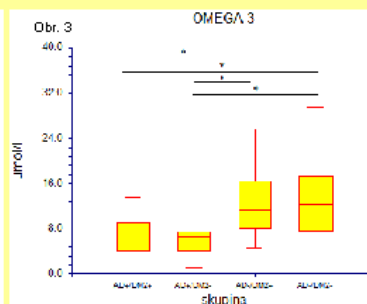
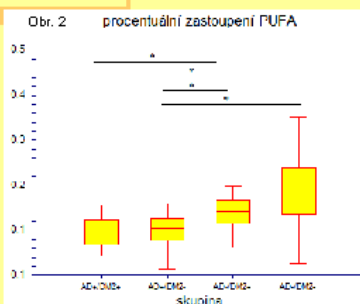
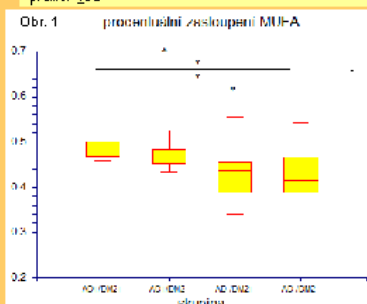
skupina	n (muži/ženy)	věk (roky)*
pacienti AD+/DM2+	12 (4/8)	78±6,7
pacienti AD+/DM2-	27 (11/16)	72±9,6
kontrolní seniori AD-/DM2+	24 (14/10)	62±7,9
kontrolní seniori AD-/DM2-	37 (10/27)	56±6,6

\*průměr ±SD

### Metodika:

- stanovení parametrů lačného glukózového a lipidového metabolismu, včetně spektra volných mastných kyselin – metoda HPLC
- statistická analýza – Kruskal-Wallisův test s mnohonásobným porovnáním (NCSS 2004)

### Výsledky:



- ↑ BMI u kontrolních seniorů s DM2 oproti ostatním souborům
- ↓ HDL-cholesterol a ↑ triacylglyceroly u kontrolních seniorů s DM2 oproti ostatním souborům
- relativně ↑ zastoupení MUFA u pacientů s AD (obr.1) oproti kontrolním seniorům
- relativně ↓ zastoupení PUFA u pacientů s AD (obr.2) oproti kontrolním seniorům
- ↓ hladiny OMEGA 3 MK u pacientů s AD (obr.3) oproti kontrolním seniorům
- ↑ poměr OMEGA 6/OMEGA 3 mastným kyselinám u pacientů s AD (obr.4) oproti kontrolním seniorům
- DM2 neměl v naší studii vliv na složení FFA
- ostatní měřené parametry (BAI, celkový cholesterol, LDL-cholesterol, celková koncentrace MK, relativní zastoupení SFA) se mezi jednotlivými skupinami nelišily

### Závěr:

V souvislosti s Alzheimerovou nemocí bylo prokázáno signifikantně odlišné spektrum volných mastných kyselin mezi pacienty s AD a kontrolními seniori. V souvislosti s diabetem 2. typu jsme významné rozdíly mezi jednotlivými soubory neprokázali.

jednotlivé položky hospitalizací – průměrné délky hospitalizací, relativní váhy (RV), celkové náklady i jednotlivé nákladové položky a výnosy. Tyto údaje byly porovnány s rokem 2012 a změnami po použití koeficientů specializace.

**Výsledky:** Celkově byli pacienti hospitalizováni pro SDN 12,5 ± 7,6 dne, průměrná RV byla 2,4 ± 1,3, průměrné výnosy 70 361 ± 37 667 Kč (medián 59 844 Kč), náklady činily 129 085 ± 78 987 Kč (medián 110 068 Kč), přičemž náklady převýšily výnosy průměrně o 55 694 Kč (79,5 %). Z nákladů na hospitalizaci tvořily nejvyšší položky ošetřovací lůžkodny (51 863 ± 30 182 Kč, medián 47 234 Kč) a laboratorní vyšetření (17 467 ± 12 388 Kč, medián 14 242 Kč), nejnižší položku operační výkony (1674 ± 3210 Kč). Nejkratší hospitalizace byly nalezeny ve skupině 3 (6,2 ± 3,9 dne), nejdélejší ve skupině 6 (25,5 ± 7,5 dne), RV se pohybovaly průměrně od 0,89 do 4,98. Téměř všechny hospitalizace (89,9 %) skončily negativní bilancí, procentuálně nejnižší finanční ztráty byly zaznamenány ve skupině 3 (-42 %; -43 952 Kč), nejvyšší ve skupině 1 (-154 %; -40 419 Kč). V porovnání s rokem 2012 nebyly nalezeny signifikantní rozdíly v ekonomické bilanci [(náklady-výnosy)/výnosy], jelikož jak náklady (p = 0,0052), tak výnosy byly za rok 2013 nižší (p = 0,0015). Byl nalezen trend ve zkrácení hospitalizací (průměrně -3,8 dne; p = 0,14) a v poklesu RV (průměrně -0,27; p = 0,171). Efekt plošného zavedení koeficientů specializace, které měly vyrovnat negativní bilanci, se v globále v terciálním centru neprojevil (p = 0,0798, zaznamenáno pouze zlepšení ve skupinách s revaskularizací 2-4; p = 0,0017 až 0,0001), jelikož byl negován snížením RV a základních tarifů za hospitalizaci.

**Závěr:** I přes snížení nákladů zkrácením hospitalizací a efektivnější lékovou politikou a zavedení koeficientů specializace nedošlo ke zlepšení finanční bilance hospitalizací pro SDN v roce 2013 v porovnání s předchozím rokem. Trvalé finanční ztráty za hospitalizace pacientů se SDN mohou vést k výraznému zhoršení kvality péče a následně i prognózy pacientů. Možným řešením do budoucna by bylo zavedení nových DRG skupin pro SDN podobných německému modelu a umožňujících adekvátní uplatnění zásad podiatrické péče podle NDP.

*Podpořeno projektem (Ministerstva zdravotnictví) rozvoje výzkumné organizace 00023001 (IKEM) – Institucionální podpora.*

#### GLUKÓZOVÁ TOLERANCE A METABOLICKÝ PROFIL U PACIENTŮ S ALZHEIMEROVOU NEMOCÍ

Vaňková M.<sup>1</sup>, Vejražková D.<sup>1</sup>, Lukášová P.<sup>1</sup>, Bradnová O.<sup>1</sup>, Vacínová G.<sup>1</sup>, Dvořáková K.<sup>1</sup>, Včelák J.<sup>1</sup>, Rusina R.<sup>2</sup>, Vaňková H.<sup>3</sup>, Holmerová I.<sup>3</sup>, Bendlová B.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Endokrinologický ústav, Praha

<sup>2</sup>Thomayerova nemocnice, Praha

<sup>3</sup>Fakulta humanitních studií Univerzity Karlovy, Praha

**Úvod:** Alzheimerova nemoc (AD) je neurodegenerativní onemocnění mozku, při kterém dochází k postupné demenci. V současné době není známa příčina vzniku AD, ale z neuropatologických nálezů se ví, jak nemoc probíhá. Existuje řada rizikových faktorů pro AD, mezi které patří i metabolické a hormonální dysregulace organismu.

**Cílem studie** bylo zmapovat metabolické a hormonální parametry u pacientů s AD ve srovnání se zdravými seniory.

**Metodika:** Vyšetřeno bylo celkem 164 nediabetických jedinců, 65 pacientů s AD (35 žen a 30 mužů; věk 76 ± 7,7 let) a 99 neurologicky zdravých seniorů (71 žen a 28 mužů; věk 67 ± 5,3 let).

Biochemická charakterizace zahrnovala vyšetření lačného glukózového a lipidového metabolismu, výpočet indexů inzulinové rezistence (HOMA R) a sekrece inzulinu (HOMA F) a další metabolické a hormonální parametry (funkce ledvin a jater, kostní metabolismus, funkce štítné žlázy). Statistická analýza byla provedena pomocí Kruskalova-Wallisova testu (NCSS 2004).

**Výsledky:** Pacienti s AD mají oproti zdravým seniorům, při stejné hodnotě indexu inzulinové rezistence (HOMA R), zvýšenou sekreci inzulinu (HOMA F; p = 0,02) a nižší hladinu lačné glykemie (p = 0,008). Pacienti s AD mají vyšší hladinu glukagonu než kontroly (p = 0,02), přestože hladina glukagonu ve stáří klesá.

Subklinická hypotyreóza se vyskytuje rovnoměrně u pacientů i kontrol, ale pacienti s AD mají oproti zdravým seniorům výrazně nižší hladinu fT3 (p < 0,0001); platí to pro obě pohlaví, nicméně výraznější je rozdíl u žen.

Parametry funkce ledvin (urea, kreatinin) mají pacienti s AD oproti zdravým seniorům vyšší (p = 0,009, resp. p < 0,001), jaterní enzymy (ALT, AST) naopak nižší (p < 0,001, resp. p = 0,001).

Homocystein, který může vypovídat o oxidačním stresu, je u pacientů s AD vyšší oproti kontrolám (p < 0,0001), naopak 25-hydroxy vitamin D, který má mimo jiné vliv i na imunitu či sekreci inzulinu, je u pacientů s AD nižší (p = 0,002). Pacienti s AD mají také vyšší hladinu osteokalcinu (p = 0,01), který se podílí na mineralizaci kostí, ale působí také jako hormon stimuluji vyšší produkci inzulinu. Prolaktin, hormon vylučovaný při psychickém stresu, je vyšší u pacientů s AD (p < 0,001). Nadměrná produkce prolaktinu však může být způsobena některými léky.

**Závěr:** Nejvýznamnějším rizikovým faktorem pro AD je pokročilý věk. Stárnutí samo o sobě není onemocnění a definice „zdravého stáří“ je komplikovaná vztahem přirozeného stárnutí a patologických procesů, které stárnutí doprovází a ovlivňují. Dysfunkce v metabolických a hormonálních pochodech ve vyšším věku může vést k řadě onemocnění, která zvyšují biologický věk na úkor věku kalendářního a mohou tak představovat významné riziko pro další onemocnění související s věkem, včetně Alzheimerovy nemoci.

IGA MZČR NT/13543-4, MZČR 00023761.

#### MIR-192, MIR-21 A MIR-200: NOVÉ MARKERY KARCINOMU PANKREATU U DIABETIKŮ

Škrha P.<sup>1</sup>, Hořínek A.<sup>2</sup>, Frič P.<sup>3</sup>, Anděl M.<sup>1</sup>, Škrha J.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>II. interní klinika 3. LF UK a FNKV, Praha

<sup>2</sup>III. interní klinika 1. LF UK a VFN, Praha

<sup>3</sup>Interní klinika 1. LF UK a ÚVN, Praha

**Úvod:** U osob středního a staršího věku může být nově diagnostikovaný diabetes mellitus (DM) již prvním symptomem karcinomu pankreatu (PC). Tento typ sekundárního diabetu (T3c) prakticky nelze odlišit od DM 2. typu. Dostatečně citlivé markery PC stále chybí. Začínají se ale objevovat slibné výsledky z oblasti molekulární genetiky v podobě microRNA (miRNA),



---

# XXXVIII. ENDOKRINOLOGICKÉ DNY S MEZINÁRODNÍ ÚČASTÍ

---

**Sborník abstrakt**

---

**15.–17. října 2015, Špindlerův Mlýn**

**GALÉN**

## SEKVENOVÁNÍ NOVÉ GENERACE V GENETICE ALZHEIMEROVY NEMOCI

G. Vacínová, J. Včelák, D. Vejražková, P. Lukášová, O. Bradnová, B. Bendlová, M. Vaňková

Oddělení molekulární endokrinologie, Endokrinologický ústav, Praha

**Úvod:** Genetické pozadí Alzheimerovy nemoci (AD) je velmi komplexní. Nejvíce je s AD spojována riziková alela  $\epsilon 4$  v genu *APOE*. Pomocí celogenomových asocičních studií bylo identifikováno dalších minimálně 10 genů, které asociují s AD. Ve studii jsme se s pomocí sekvenování nové generace kromě genu *APOE* zaměřili na gen *CRI* spojovaným s imunitní odpovědí, gen *CLU* spojovaným s metabolismem cholesterolu a na gen *BIN1* spojovaným se synaptickou funkcí.

**Metodika:** Celkem bylo vyšetřeno 78 pacientů s AD a 38 kontrol. U souborů byl sekvenován 4. exon *APOE*. Výsledky sekvenování byly porovnány s výsledky analýzy RFLP. Dále byly vyšetřeny 1., 2. a 3. exon *APOE*, 38. a 39. exon *CRI*, 5., 6., 7. a 8. exon *CLU* a 6. exon *BIN1*. Analýza probíhala pomocí sekvenátoru nové generace MiSeq (Illumina). Nalezené varianty byly porovnány s referenční sekvencí hg19 a vyhodnoceny pomocí programu Integrative Genomics Viewer.

**Výsledky:** Sekvence 4. exonu *APOE* potvrdila výsledky zjištěné metodou RFLP. Sekvence ostatních exonů vybraných genů objevila některé genetické varianty, které se nacházely u obou souborů a v rozvoji AD pravděpodobně nemají význam. Žádná dosud nepopsaná varianta nebyla v našem souboru nalezena.

**Závěr:** Sekvenování nové generace zjednodušuje analýzu genů spojovaných s AD, umožňuje sekvenovat mnoho genů během jedné analýzy a usnadňuje vyhledávání nových variant v kandidátních genech, které by se mohly podílet na patogenezi onemocnění.

Podporováno IGA MZ ČR NT/13543-4, MZ ČR – RVO (EÚ, 00023761)

## PILOTNÍ ANALÝZA GENU ZBTB16 PRO STUDIUM ASOCIACE S METABOLICKÝM SYNDROMEM

J. Včelák<sup>1</sup>, B. Bendlová<sup>1</sup>, M. Vaňková<sup>1</sup>, P. Lukášová<sup>1</sup>, D. Vejražková<sup>1</sup>, O. Bradnová<sup>1</sup>, O. Šeda<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Endokrinologický ústav, Praha, <sup>2</sup>Ústav biologie a lékařské genetiky, 1. lékařská fakulta Univerzity Karlovy a Všeobecná fakultní nemocnice, Praha

**Úvod:** Metabolický syndrom (MS) je charakterizovaný současnou manifestací dyslipidémie, inzulínové rezistence, obezity, hypertenze a souvisejících metabolických

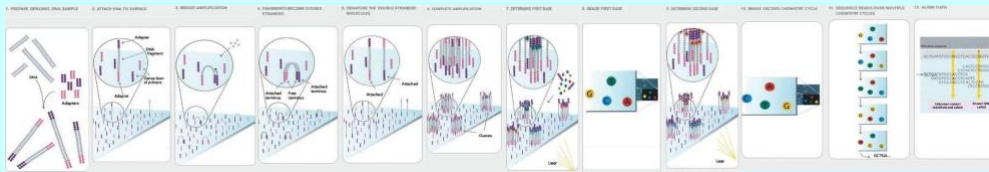
## Úvod:

Genetické pozadí Alzheimerovy nemoci (AD) je velmi komplexní. Nejvíce je s AD spojována riziková alela  $\epsilon 4$  v genu *APOE*. Pomocí celogenomových asociačních studií bylo identifikováno dalších minimálně 10 genů (*BIN1*, *CR1*, *CLU*, *PICALM*, *MS4A4/MS4A6E*, *CD2AP*, *CD33*, *EPHA1* a *ABCA7*), které asociují s AD. Naše studie se zaměřila na následující geny: gen *APOE* nejčastěji spojovaný s AD, gen *CR1* spojovaný s imunitní odpovědí, gen *CLU* spojovaný s metabolismem cholesterolu a gen *BIN1* spojovaný se synaptickou funkcí. Cílem studie bylo zjistit možnosti využití sekvenování nové generace v diagnostice AD.

## Metodika:

Sekvenování nové generace (NGS) je metoda umožňující sekvenovat tisíce až miliony sekvencí během jedné analýzy. Sekvenování probíhá podle následujícího schématu:

fragmentace DNA → hybridizace s adaptory → příprava knihoven → tvorba klastrů a jejich ukotvení → sekvenování → analýza dat



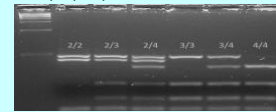
(<http://www.illumina.com/technology/next-generation-sequencing.html>)

Celkem bylo vyšetřeno 78 pacientů s AD a 38 kontrolních seniorů. Analýza probíhala pomocí sekvenátoru nové generace MiSeq (Illumina). Nalezené varianty byly porovnány s referenční sekvencí hg19 a vyhodnoceny pomocí programu Integrative Genomics Viewer. Výsledky sekvenování 4. exonu *APOE* byly porovnány s výsledky analýzy RFLP. Dále byly vyšetřeny 1., 2. a 3. exon *APOE*, 38. a 39. exon *CR1*, 5., 6., 7., a 8. exon *CLU* a 6. exon *BIN1*.

## Výsledky:

➤ sekvenace 4. exonu *APOE* pomocí NGS potvrdila výsledky zjištěné metodou RFLP (Obr. 1 a 2a-f):

Obr. 1: Výsledky metody RFLP

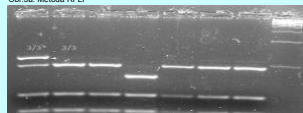


Obr. 2a-f: Výsledky metody NGS

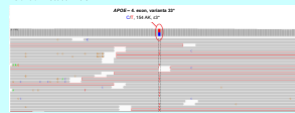


➤ metoda NGS objevila v tomto exonu i vzácnou variantu alely  $\epsilon 3 \rightarrow \epsilon 3^*$  (Obr. 3a-b):

Obr. 3a: Metoda RFLP



Obr. 3b: Metoda NGS



➤ Sekvenace ostatních exonů vybraných genů našla následující varianty (Tab. 1):

Tab. 1: Zachycené varianty pomocí NGS	CR 1	CLU			BIN1	
nalezená varianta	–	rs7982 - 5. exon	rs9331916 - intron	rs28541694 - intron	rs3216167 - intron	rs1060743 - 6. exon
záměna		A/G	C/T	C/G	A/-	A/G
význam v AD		synonymní varianta	?	?	?	zvyšuje riziko rozvoje AD
pacienti AD		78/69*	78/28*	78/24*	78/41*	78/35*
kontrolní seniori		38/28*	38/10*	38/13*	38/19*	38/13*

\*celkem/jedinci s nalezenou variantou

## Závěr:

Sekvenování nové generace zjednodušuje analýzu genů spojovaných s AD, umožňuje sekvenovat mnoho genů během jedné analýzy a usnadňuje vyhledávání nových variant v kandidátních genech, které by se mohly podílet na patogenezi tohoto onemocnění.

zena, bylo analyzováno 94 genů spojovaných s nádorovými onemocněními pomocí NGS za použití panelu Trusight Cancer Sequencing (Illumina). Po odfiltrování polymorfismů jsme se zaměřili na nové či vzácné varianty v kódujících sekvencích, jejichž možná patogenita byla testována *in silico* (SIFT, PolyPhen). Detekované varianty byly ověřeny na kapilárním sekvenátoru CEQ8000 a zjišťovány u rodinných příslušníků.

**Výsledek:** V každé rodině bylo detekováno několik slibných variant v genech *CHEK2*, *MET*, *APC*, *RHBDF2* a *XPA*, které jsou začleněny do klíčových procesů vedoucích k tumorigenezi, jako reparační geny, tumor supresorové geny atd.

**Závěr:** Nové kandidátní geny mohou reprezentovat genetické modifikační faktory či klíčové geny v každé rodině. Nalezené mutace je nutné dále studovat, zapotřebí je ale dobrá charakterizace rodin, tedy zapojení většího množství rodinných příslušníků včetně podrobných klinických dat.

Podpořeno IGA MZČR NT13901-4 a MZČR – RVO 00023761

## SNÍŽENÁ AKTIVITA ENZYMU SULT2A1 U PACIENTŮ S ALZHEIMEROVOU NEMOCÍ

*M. Vaňková<sup>1</sup>, M. Hill<sup>1</sup>, M. Velíková<sup>1</sup>, J. Včelák<sup>1</sup>, G. Vacínová<sup>1</sup>, P. Lukášová<sup>1</sup>, D. Vejražková<sup>1</sup>, K. Dvořáková<sup>1</sup>, R. Rusina<sup>2</sup>, I. Holmerová<sup>3</sup>, H. Vaňková<sup>3</sup>, B. Bendlová<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Endokrinologický ústav, Praha, <sup>2</sup>Thomayerova nemocnice, Praha,

<sup>3</sup>Fakulta humanitních studií Univerzity Karlovy, Praha

Sulfotransferázy jsou enzymy zapojené do biotransformace léků, xenobiotik a endogenních látek, včetně steroidních hormonů. Lidská izoforma SULT2A1 je exprirována především v nadledvinách. Enzym je zodpovědný za sulfataci hydroxysteroidů, včetně DHEA, androgenů, pregnenolonu a žlučových kyselin.

Alzheimerova nemoc (AD) je neurodegenerativní onemocnění mozku a představuje více než polovinu všech demencí u seniorů. Snížené hladiny sulfátů DHEA a pregnenolonu v cirkulaci jsou u lidí spojované se sníženou kognitivní funkcí. Nízké hladiny DHEA sulfátu jsou popisovány i u pacientů s AD.

**Cílem** naší studie bylo zjistit, zda je aktivita SULT2A1, predikovaná na základě poměrů produktů k prekurzorům (sulfát/nekonjugovaný steroid), odlišná u pacientů s AD ve srovnání se zdravými seniory.

**Metodika:** Studie se účastnilo 34 pacientů s AD a 33 kontrol odpovídajícího věku. Hladiny cirkulujících steroidů a jejich sulfátů byly stanoveny metodou GC-MS.

**Výsledek:** Pacienti s AD mají snížené poměry sulfátů k nekonjugovaným formám u C19 steroidů. Pacienti mají nižší poměry u steroidů, které jsou sulfatovány hojně v nadledvině (DHEA,  $p = 0,04$ ; androsteron,  $p = 0,03$ ; epiandrosteron,



$p = 0,01$ ). Zatímco poměry u androstendionu, etiocholanolonu a epietiocholanolonu, u kterých dochází k sulfataci mimo nadledvinu, se mezi pacienty a kontrolami neliší.

**Závěr:** Poměry sulfátů k nekonjugovaným formám cirkulujících steroidů mohou vypovídat o aktivitě periferních enzymů. Vzhledem k tomu, že periferní steroidogeneze může podstatně ovlivňovat aktivitu neuronů v mozku, je pravděpodobné, že zjištěná snížená aktivita SULT2A1 může přispívat k patologii AD.

IGA MZ ČR NT/13543-4, MZ ČR 00023761 (Endokrinologický ústav)

## SÚČASNÉ MOŽNOSTI LIEČBY AKROMEGÁLIE NA SLOVENSKU

*P. Vaňuga*

*Národný endokrinologický a diabetologický ústav, n.o., Lubochňa, Slovenská republika*

Akromegália (AM) patrí k málo častým endokrinopatiám, preto manažment liečby tohto ochorenia by mal prebiehať v špecializovaných centrách so skúsenosťami v danej oblasti. Prvou líniou liečby AM je operačné riešenie známeho adenómu hypofýzy. Liečba analógmi somatostatínu (SSA) je považovaná štandardne za druhú voľnu (pri neúspechu operačnej intervencie) avšak podľa konsenzu o AM z 11/2007 (Miami, USA) môže byť použitá v prvej línii u vybraných pacientov. Do úvahy pripadá aj ožiarenie rezídua adenómu hypofýzy Lekselovým gamanožom, alebo LINAC-om, pri tejto modalite je potrebná aj dlhodobá medikamentózna liečba.

V medikamentóznej liečbe AM sú na Slovensku dlhodobo používané 2 typy SSA octreotid a lanreotide v depotných formách. Interval podávania SSA sa pohybuje v rozmedzí 28 až 56 dní. Keďže účinnosť liečby SSA sa pohybuje v rozmedzí 50-80 %, nedostatočný efekt liečby môžeme potencovať priradením dopaminergných agonistov (kabergolín) alebo blokátora receptora rastového hormónu (pegvisomant). Posledne menovaný preparát je možné podávať aj samostatne, avšak v našej klinickej praxi je používaný len v kombinácii so SSA, a to aj z dôvodu finančnej náročnosti. V máji 2015 pribudla možnosť liečby AM novým typom SSA – pasireotidom, ktorý je vyhradený pre pacientov so zlyhaním liečby iným typom SSA. Dostupný je v depotnej forme v dvoch silách (40 mg a 60 mg) s podávaním 1 ´ za 4 týždne intra-muskulárne. Skúsenosti s týmto preparátom na nás ešte len čakajú.

**19.–21. října 2017, Praha**



**40.**

**ENDOKRINOLOGICKÉ DNY  
S MEZINÁRODNÍ ÚČASTÍ**



**Sborník abstrakt**

Klinické příznaky CS jsou obecně dobře známé a relativně nápadné. Přesto je medián mezi vznikem onemocnění a stanovením správné diagnózy velmi dlouhý a mnoho nositelů CS není během svého života diagnostikováno vůbec. Typické je rozložení tuku v oblasti obličeje (měsícovitý obličej), v nadklíčkových krajinách a v oblasti krku, centrální typ obezity, tenké končetiny a nápadné strie zbarvené do tmavě červeně. Pacienti mají často sekundární hypertenzi, mezi další komplikace patří diabetes mellitus a osteoporóza. Pacienti s CS mají obecně násobně vyšší morbiditu i mortalitu proti zdravé populaci.

Pro diagnostiku je kromě anamnézy a kliniky zcela zásadní laboratorní vyšetření. Zvýšená hladina sérového kortisolu, plochá křivka cirkadiálního rytmu a dexamethazonový supresní test jsou pro diagnostiku CS zásadní. Dále jsou typické změny v mineralogramu, vysoké odpady kortisolu do moči a řada dalších více či méně specifických laboratorních změn. Hladina ACTH určí, zda uvažovat o onemocnění nadledvin nebo se jedná o ACTH dependentní CS.

Samostatnou problematiku tvoří subklinická forma CS, není náplní tohoto sdělení.

V kazuistice budu prezentovat případ muže (66 let) s CS, u něhož byla k diagnostice důležitá interpretace dlouhého dexamethazonového supresního testu. Kauzální souvislost s pokročilým neuroendokrinním nádorem jejuna prokazuje i ústup projevů CS při efektivní protinádorové léčbě.

## PACIENTI S IGA NEFROPATÍÍ LÉČENÍ PREDNISONEM MAJÍ ZMĚNĚNÉ HLADINY IMMUNOMODULAČNÍCH C19 STEROIDŮ. JE VHDNĚ LÉČBU KORTIKOIDY DOPLNIT NADLEDVINOVÝMI ANDROGENY?

I. Šterzl, M. Hill\*, L. Stárka, M. Velíková, R. Kančeva, J. Jemelková<sup>1</sup>, L. Czerneková<sup>1</sup>, P. Kozstyu<sup>1</sup>, J. Zadražil<sup>1</sup>, K. Matoušovic<sup>2</sup>, K. Vondrák<sup>2</sup>, M. Raška<sup>1</sup>

Endokrinologický ústav, Praha; <sup>1</sup>Lékařská fakulta Univerzity Palackého a Fakultní nemocnice, Olomouc; <sup>2</sup>2. lékařská fakulta Univerzity Karlovy a Fakultní nemocnice v Motole, Praha

Terapie autoimunitních onemocnění glukokortikoidy (GC) sebou nese řadu vedlejších účinků, jako je omezená funkce gonád, poruchy v oblasti gastrointestinálního traktu a narušení hypothalamo-hypofyzárně-nadledvinové osy atd. Nejznámějšími antagonisty GC jsou androgeny. Adrenální androgeny jsou imunoprotektivní díky převažujícího vlivu na aktivaci Th1 lymfocytů oproti lymfocytům Th2. Jejich hladiny včetně prekurzorů a metabolitů jsme sledovali u pacientů s IgA nefropatií léčených prednisolonem.

**Metodika:** Porovnávali jsme skupiny 1. zdravých jedinců, 2. pacientů léčených GC pro jiné autoimunitní onemocnění a 3. pacientů léčených GC s IgA neuropatií. Skupina IgAN byla sledována na začátku léčby prednisolonem (NO) po jednom týdnu (N1) a po jednom měsíci (N2) terapie. Rozdíly mezi skupinami byly hodnoceny jednofaktorovou metodou ANOVA, zatímco změny během léčby prednisolonem modelem ANOVA s opakováním a faktorem s opakováním léčba.

**Výsledky:** Primárně, pacienti s IgGN a pacienti s jinými autoimunitními chorobami měli značný nedostatek imunoprotektivních androgenů pravděpodobně z důvodu oslabení aktivity „zóny retikuláris“ a navíc jejich nízké hladiny a hladiny jejich účinných 7alfa, 7beta a 16alfa-hydroxy-metabolitů byly dále sníženy během terapie GC.

**Závěr:** Na základě výše uvedených výsledků a údajů z literatury jsme si položili otázku, zda by nebyla vhodnější při terapii GC, kombinace GC léčby s imunoprotektivními  $\Delta 5$  steroidy, jejich 7alfa, 7beta a 16alfa-hydroxy metabolity nebo jejich stabilními syntetickými deriváty. Tato kombinace by mohla být výhodná obecně pro léčbu autoimunitních onemocnění zprostředkovaných protilátkami oproti léčbě samotnými GC.

Práce byla podpořena projektem MZ ČR koncepčního rozvoje výzkumné organizace 0023761

## HLADINY CCL5/RANTES U PACIENTŮ S ALZHEIMEROVOU NEMOCÍ A U ZDRAVÝCH SENIORŮ

G. Vacínová<sup>1,2</sup>, J. Včelák<sup>1</sup>, D. Vejražková<sup>1</sup>, P. Lukášová<sup>1</sup>, B. Bendlová<sup>1</sup>, M. Vaňková<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Oddělení molekulární endokrinologie, Endokrinologický ústav, Praha; <sup>2</sup>Katedra antropologie a genetiky člověka, Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy, Praha

**Úvod:** Alzheimerova nemoc (AD) je neurodegenerativní onemocnění, jehož prevalence neustále stoupá a začíná být alarmující. Kromě genetického pozadí (nejvýznamněji je zapojen gen APOE a jeho riziková alela  $\epsilon 4$ ) se na vzniku a rozvoji AD podílí i pozadí biochemické. C-C chemokín ligand 5 (CCL5) známý též jako RANTES (*regulated upon activation normal T cell expressed and secreted*) je protein indukující migraci T buněk a monocytů, podílí se na pohybu *natural killer* buněk, dendritických a žírných buněk atd. Zvýšená produkce CCL5 je specifickým ukazatelem zánětu a jeho zvýšené hladiny v periferní cirkulaci jsou asociovány s řadou zánětlivých a neurologických onemocnění včetně AD. Cílem studie bylo zjistit, zda jsou mezi pacienty s AD a zdravými seniory rozdíly v hladinách cirkulujícího CCL5.

**Metodika:** Celkem bylo vyšetřeno 147 jedinců, z toho 85 pacientů s AD (39 mužů a 46 žen; věk  $76 \pm 8,8$  let) a 62 seniorů bez zatížení AD nebo jiným neurologickým onemocněním (20 mužů a 42 žen; věk  $68 \pm 5,6$  let). Hladina cirkulujícího chemokínu CCL5 byla stanovena v rámci multiplexového kitu (HNDG3MAG-36K Human Neurodegenerative Disease Magnetic Bead Panel 3, Millipore) na přístroji Bio-Plex 200. Pro statistickou analýzu byla použita neparametrická ANOVA (NCSS 2004).

**Výsledky:** Pacienti s AD mají významně vyšší hladiny cirkulujícího CCL5 oproti zdravým seniorům (AD pacienti: medián 75539 pg/ml (LCL 64598; UCL 87490); zdraví senioři: medián 746 pg/ml (LCL 477; UCL 937);  $p < 0,05$ ). U pacientů s AD jsme nezaznamenali vliv pohlaví na cirkulující hladiny CCL5, u zdravých seniorů jsme zaznamenali vyšší hladiny cirkulujícího CCL5 u mužů oproti ženám (muži: medián 1363 pg/ml (LCL 854; UCL 3095); ženy: medián 562 pg/ml (LCL 462; UCL 775);  $p < 0,05$ )).

**Závěr:** V této studii jsme zjistili významné rozdíly v hladinách cirkulujícího CCL5 u souboru pacientů s AD oproti zdravým seniorům. Vysoké hladiny CCL5 u pacientů s AD pravděpodobně souvisejí se zánětem, který bývá u pacientů s AD často popisován.

MZ ČR RVO EÚ 00023761, MEYS CR (OP RDE, Excellent Research – ENDO.CZ)

## ASOCIJÍ SOMATICKÉ ALTERACE V GENECH RET A RAS U PACIENTŮ SE SPORADICKÝM MEDULÁRNÍM KARCINOMEM ŠTÍTNÉ ŽLÁZY S HORŠÍMI KLINICKÝMI PROJEVY ONEMOCNĚNÍ?

*E. Václavíková, Š. Dvořáková, V. Sýkorová, J. Včelák, P. Vlček, B. Bendlová*

Oddelení molekulární endokrinologie, Endokrinologický ústav, Praha; <sup>1</sup>Klinika nukleární medicíny a endokrinologie, lékařská fakulta Univerzity Karlovy a Fakultní nemocnice v Motole, Praha

**Úvod:** Aktivující somatické mutace v *RET* proto-onkogenu jsou příčinou vzniku sporadické formy medulárního karcinomu štítné žlázy (MTC). Ve vyšetřených vzorcích nádorové tkáně byly odhaleny také mutace v genech *RAS*. Naším cílem bylo u českých pacientů se sporadickým MTC analyzovat somatické alterace v genech *RET*, *H-RAS*, *K-RAS* a *N-RAS* a zaměřit se na korelaci detekovaných mutací a klinické manifestaci onemocnění.

**Metodika:** Vyšetřeno bylo 128 vzorků DNA pacientů se sporadickým MTC, izolovaných z 64 čerstvě zamražených tkání a 64 parafinových bločků. Analýza mutací v *RET* proto-onkogenu byla provedena přímou sekvenací Sangerovou metodou na kapilárním sekvenátoru CEQ8000 (Beckman Coulter), avšak většina vzorků byla dodatečně verifikována amplikonovým sekvenováním nové generace (NGS) na sekvenátoru MiSeq (Illumina), jímž byly následně vyšetřeny také mutace v genech *RAS*.

**Výsledky:** Somatické mutace v *RET* proto-onkogenu byly detekovány u 57 pacientů (44,5 %). Nejvíce zastoupená byla mutace Met918Thr lokalizovaná v 16. exonu, a to u 28,1 % pacientů. Často nalezené byly také 6bp či 15bp delece v 11. exonu *RET* proto-onkogenu. Mutace v genech *RAS* byly zjištěny pouze u pacientů, kteří neměli detekovanou mutaci v *RET* proto-onkogenu (37,8 % *RET*-negativních pacientů). Převažovaly mutace v genu *H-RAS* (Gln61Arg, Gly13Arg), naopak v genu *N-RAS* nebyla u MTC objevena žádná mutace.

Statistické vyhodnocení odhalilo signifikantní rozdíly ( $p < 0,05$ ) při porovnání souboru pacientů se somatickou mutací v *RET* proto-onkogenu s pacienty bez somatické mutace. Odlišnosti byly zjištěny ve vyhodnocení postoperačních hladin kalcitoninu, TNM klasifikace (velikost tumoru, lokální a vzdálené metastázy) a recidivy onemocnění, kdy pacienti s mutací v *RET* proto-onkogenu měli významně vyšší hladiny kalcitoninu po operaci, horší TNM klasifikaci tumoru a častěji se u nich objevila recidiva onemocnění. Naproti tomu u pacientů s mutací v genech *RAS* nebyly zaznamenány významné rozdíly od pacientů bez mutace.

**Závěr:** Analýza potvrdila, že prevalence mutací v *RET* proto-onkogenu je u českých pacientů srovnatelná s jinými zeměmi. Statistické vyhodnocení prokázalo, že jejich přítomnost je významně asociována s horšími klinicko-patologickými znaky onemocnění. U *RAS* mutací žádná asociace se závažnějšími projevy nemoci zjištěna nebyla. Také z metodického hlediska přinesla studie pozitivní zjištění. Při porovnání obou technik sekvenování se sekvenování nové generace projevil jako metoda přínosná pro snazší vyhodnocení delecí či insercí. A co je podstatnější, sekvenování nové generace zvyšuje záchyt somatických mutací, jelikož je oproti klasickému sekvenování schopné odhalit mutaci i ve vzorku s velmi malým zastoupením nádorových buněk.

Práce byla podpořena grantovými projekty AZV 16-32665A, MZČR RVO EÚ 00023761, MEYS CR (OP RDE, Excellent Research – ENDO.CZ)

## ZBTB16 – NOVÝ KANDIDÁTNÍ GEN PRO OBEZITU U ČESKÝCH ADOLESCENTŮ

*M. Vaňková, B. Bendlová, D. Vejražková, P. Lukášová, H. Zamrazilová, M. Kunešová, V. Hainer, L. Šedová, O. Šeda, J. Včelák*

Endokrinologický ústav, Praha; Ústav biologie a lékařské genetiky, 1. lékařská fakulta Univerzity Karlovy a Všeobecná fakultní nemocnice, Praha

**Úvod:** Gen *ZBTB16* byl u člověka původně objeven v souvislosti s akutní leukémií. Nicméně na krysích modelech se podařilo prokázat souvislost s obezitou, srdeční hypertrofií, inzulinovou senzitivitou a hladinou krevních lipidů. Metabolická role *ZBTB16* u člověka není zatím objasněna a ověření vlivu genetických variant genu pro *ZBTB16* na metabolické funkce u člověka je předmětem současného výzkumu.

**Cílem této studie** bylo zjistit asociaci variant v genu pro *ZBTB16* s nadváhou a obezitou a s dalšími parametry metabolického syndromu u českých adolescentů.

**Metodika:** Do studie bylo zařazeno celkem 1984 adolescentů ve věku 13–19 let (1075 dívek a 909 chlapců), kteří se účastnili projektu COPAT (Czech Childhood Obesity Prevalence And Treatment) zaměřeného na sledování rizikových faktorů pro obezitu a metabolický syndrom. Metabolický syndrom dle kritérií IDF (2005) splňovalo 7,8 % adolescentů. Přítomnost obezity je povinným kritériem metabolického syndromu dle IDF, ze zbývajících kritérií byl nejčastěji zastoupený vyšší krevní tlak (35,5 %), nízký HDL-cholesterol (30,7 %) a dále vyšší triacylglyceroly (10,3 %) a vyšší lačná glykémie (8,4 %). Dívek s nadváhou a obezitou (BMI  $\geq 90$  percentil) bylo 510 (SDS BMI  $2,4 \pm 0,65$ ), z toho obézních (BMI  $\geq 97$  percentil) bylo 430 (SDS BMI  $2,6 \pm 0,51$ ). Chlapců s nadváhou a obezitou bylo 395 (SDS BMI  $2,4 \pm 0,7$ ), z toho obézních bylo 332 (SDS BMI  $2,7 \pm 0,55$ ).

Genotypizace 9 polymorfizmů v genu pro *ZBTB16* (rs11214863, rs593731, rs763857, rs2846027, rs681200, rs686989, rs661223, rs675044, rs567057) byla provedena technologií TaqMan SNP genotyping assays na přístroji Biomark (Fluidigm) a RealTime LC480 (Roche). Haplotypová a statistická analýza byly provedeny programy HaploView a Phase.



# Hladiny CCL5/RANTES u pacientů s Alzheimerovou nemocí a u zdravých seniorů



Vacínová G.<sup>1,2</sup>, Včelák J.<sup>1</sup>, Vejražková D.<sup>1</sup>, Lukášová P.<sup>1</sup>, Bendlová B.<sup>1</sup>, Vaňková M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Endokrinnologický ústav, Oddělení molekulární endokrinologie, Praha

<sup>2</sup>Přírodovědecká fakulta UK, Katedra Antropologie a genetiky člověka, Praha

## Úvod:

Alzheimerova nemoc (AD) je neurodegenerativní onemocnění, které převážně postihuje populaci starší 65 let. Na vzniku a rozvoji pozdní formy AD se podílejí faktory genetické i faktory vnějšího prostředí. Spolu s těmito faktory přispívají k rozvoji AD i biochemické markery včetně markerů souvisejících se vznikem zánětu.

C-C chemokin ligand 5 (CCL5) známý též jako RANTES (*regulated upon activation normal T cell expressed and secreted*) je protein indukující migraci T buněk a monocytů do oblastí zánětu, podílí se na pohybu *natural killer* buněk, dendritických a žírných buněk atd. Působí prostřednictvím receptorů (CCR1, CCR3, CCR4 a CCR5) a jeho zvýšená produkce je specifickým ukazatelem zánětu. Zvýšené hladiny CCL5 v periferní cirkulaci jsou asociovány s řadou zánětlivých a neurologických onemocnění.

**Cílem** studie bylo zjistit, zda jsou mezi pacienty s AD a zdravými seniory rozdíly v hladinách cirkulujícího CCL5 a zda může CCL5 vypovídat o přítomnosti zánětu.

## Soubor:

➤ celkem bylo vyšetřeno 147 jedinců (AD 85, zdraví seniři 62)

➤ pacienti s AD byli diagnostikováni dle mezinárodních kritérií NINCDS-ADRDA, součástí vyšetření byly neuropsychologické testy (RBANS, MoCA, GDS), analýza cerebrospinální tekutiny a magnetické rezonance hlavy

➤ kontrolní seniři absolvovali stejný protokol vyšetření jako pacienti s AD kromě odběru cerebrospinální tekutiny

skupina	n (muži/ženy)	věk (roky)*
pacienti s AD	85 (39/46)	76±8,8
zdraví seniři	62 (20/42)	68±5,6

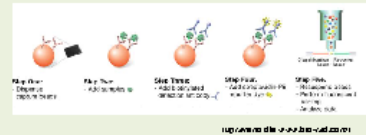
\* průměr ± SD

## Metodika:

➤ vyšetření bylo provedeno z krevní plazmy

➤ hladina cirkulujícího CCL5 byla stanovena v rámci multiplexového kitu *Neurodegenerative Disease Magnetic Bead Panel 3* na přístroji Bio-Plex 200

➤ statistická analýza - neparametrická ANOVA (NCSS 2004)



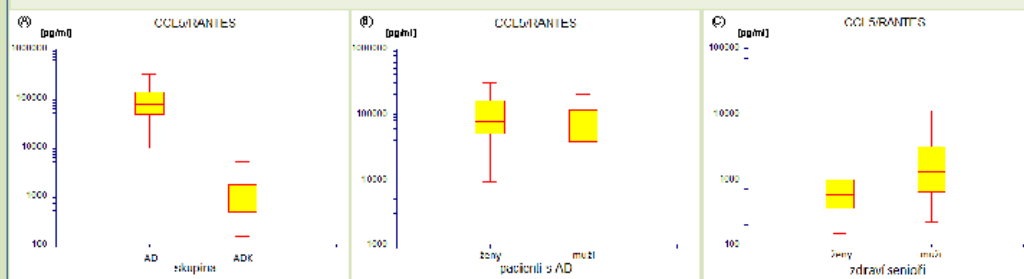
## Výsledky:

➤ pacienti s AD mají významně vyšší hladiny cirkulujícího CCL5 oproti zdravým seniorům

skupina	medián [pg/ml]	95% LCL	95% UCL	p
pacienti s AD	75 539	64 598	87 490	<0,000001
zdraví seniři	746	477	937	

➤ vliv pohlaví na hladiny cirkulujícího CCL5 u pacientů s AD nebyl patrný, u zdravých seniorů byly hladiny cirkulujícího CCL5 vyšší u mužů oproti ženám

skupina	pohlaví	medián [pg/ml]	95% LCL	95% UCL	p
pacienti s AD	muži	67 357	46 603	98 627	0,127078
	ženy	79 230	64 598	119 893	
zdraví seniři	muži	1363	854	3095	0,003320
	ženy	562	462	775	



Obr.: Hladiny cirkulujícího CCL5 u pacientů s AD a u zdravých seniorů; (A) – rozdíl v hladinách CCL5 mezi pacienty s AD a kontrolní skupinou (B) – rozdíl v hladinách CCL5 mezi muži a ženami s AD; (C) – rozdíl v hladinách CCL5 mezi muži a ženami bez zánětlivých onemocnění. Rozdíly mezi skupinami jsou statisticky významné pomocí logaritmické ANOVY.

## Závěr:

Ve studii jsme zjistili významné rozdíly v hladinách cirkulujícího CCL5 u souboru pacientů s AD oproti zdravým seniorům. Vysoké hladiny CCL5 u pacientů s AD pravděpodobně souvisejí se zánětem, který bývá u pacientů s AD často popisován. Vliv pohlaví na hladiny CCL5 u pacientů s AD nebyl patrný. U kontrolní skupiny zdravých seniorů jsme zaznamenali vyšší hladiny CCL5 u mužů oproti ženám.