

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Irena I. Jovanović Macura

UTICAJ SUPLEMENTACIJE RIBLJIM ULJEM  
NA METABOLIZAM HOLESTEROLA U  
MREŽNJAČI MIŠA TOKOM FIZIOLOŠKOG  
STARENJA I U MODELU ALCHAJMEROVE  
BOLESTI

doktorska disertacija

Beograd, 2024

UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF BIOLOGY

Irena I. Jovanović Macura

THE EFFECT OF FISH OIL TREATMENT  
ON CHOLESTEROL METABOLISM IN  
MOUSE RETINA DURING  
PHYSIOLOGICAL AGING AND IN  
ALZHEIMER'S DISEASE MODEL

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2024

**Mentori:**

1. **dr Sanja Ivković**, viši naučni saradnik, Institut za nuklearne nauke „Vinča”, Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerzitet u Beogradu
2. **dr Nadežda Nedeljković**, redovni profesor, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

**Članovi komisije:**

1. **dr Sanja Dacić**, docent, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu
2. **dr Jelena Ćirić**, viši naučni saradnik, Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković”, Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerzitet u Beogradu
3. **dr Miloš Mitić**, viši naučni saradnik, Institut za nuklearne nauke „Vinča”, Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerzitet u Beogradu

Datum odbrane \_\_\_\_\_

Eksperimentalni deo ove doktorske disertacije urađen je na Odeljenju za neurobiologiju Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković” - Instituta od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerziteta u Beogradu, u okviru projekta „Plastičnost mozga tokom starenja: uticaj dijetalne restrikcije i anestezije“ (broj 173056) i projekata 451-03-68/2020-14/200007, 451-03-9/2021-14/200007, 451-03-68/2022/14-200007, 451-03-47/2023-01/200007 i 451-03-66/2024-03/200007 finansiranog od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, odnosno Ministarstva nauke, tehnološkog razvoja i inovacija Republike Srbije.

## **ZAHVALNICA**

*Pre svega bih htela da se zahvalim svojoj mentorki, dr Sanji Ivković, kako na profesionalnom, tako i na privatnom odnosu koje smo izgradile tokom izvedbe ovog doktorata, na ogromnoj pomoći u pisanju radova i teze, na datom prostoru za napredovanje na poslovnom i ličnom planu, kao i na svim naučenim životnim lekcijama.*

*Htela bih da se zahvalim svojoj komentorki, dr Nadeždi Nedeljković, na pruženoj podršci, otvorenosti i razumevanju, kao i na brojnim savetima i pomoći u pisanju disertacije.*

*Zahvaljujem se dr Sanji Dacić i dr Jeleni Ćirić na stipljenju, razumevanju i ogromnoj pomoći u uobličavanju ove teze.*

*Zahvaljujem se dr Milošu Mitiću na svom detaljnom oku i pomoći tokom pisanja disertacije.*

*Zahvaljujem se dr Selmi Kanazir na mogućnosti da radim u Laboratoriji za molekularnu neurobiologiju i ponašanje, Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“.*

*Zahvaljujem se dr Milki Perović na velikoj podršci i savetima tokom izrade i pisanja doktorske disertacije.*

*Zahvaljujem se dr Željku Pavkoviću i kolegini Milici Prvulović na pomoći u savladavanju brojnih eksperimentalnih tehnika.*

*Zahvaljujem se dr Vesni Pešić, dr Aleksandri Mladenović, dr Desanki Milanović, dr Smilji Pracer, dr Maji Srbovan, dr Srđanu Sokanović, kao i mlađim kolegincama i kolegi, dr Milici Potrebić, Anđeli, Valentini, Mileni, Olgi i Nikoli na podršci i pomoći.*

*Zahvaljujem se svojoj deci, Ivoni i Iliji, svom mužu, Čedomiru, i svojoj majci, Dragani, na ljubavi, razumevanju i podršci pruženim tokom svih ovih godina.*

*Zahvaljujem se svim svojim prijateljima, kao i svima onima koji više nisu sa nama, a čije prisustvo se i te kako oseti.*

# Uticaj suplementacije ribljim uljem na metabolizam holesterola u mrežnjači miša tokom fiziološkog starenja i u modelu Alchajmerove bolesti

## Sažetak

Mrežnjača je jedini deo centralnog nervnog sistema (CNS) koji može direktno da se analizira neinvazivnim metodama, a rane promene u mrežnjači mogu da ukažu na neurodegenerativne promene u mozgu. S obzirom da je starenje jedan od glavnih faktora rizika za Alchajmerovu bolest (AB) bolje razumevanje promena u mrežnjači povezanih sa starenjem mogu da imaju veliki dijagnostički potencijal.

Holesterol ima važnu ulogu u procesu starenja, a kod AB reguliše toksičnost amiloida-beta ( $A\beta$ ) i utiče na propustljivost krvno-mrežnjačne barijere (KMrB). Zato je održavanje pravilne homeostaze holesterola izuzetno važno. Suplementacija visokim dozama ribljeg ulja (RU) može značajno da utiče na homeostazu holesterola kao i da odloži početak ispoljavanja simptoma AB.

Ova istraživanja su imala za cilj da ukažu na specifične promene koje se dešavaju u mrežnjači u toku fiziološkog i patološkog starenja. Pored toga, evaluiran je i terapijski efekat kratkotrajnog tretmana visokim dozama RU u presimptomatskoj fazi AB. Ove promene su ispitivane u mrežnjačama i pigmentnom epitelu mrežnjače (MPE) ženki divljeg soja (B6SJLF1 miševi) i 5XFAD animalnog modela AB. Takođe, ispitivane su promene na krvnim sudovima nastale nakon nagomilavanja  $A\beta$  u starenju kao i nakon tretmana RU.

S obzirom da je metabolizam holesterola u mrežnjači, kao i u mozgu, kod 5XFAD miševa atenutiran, tretman RU nije pokazao značajan efekat na regulaciju homeostaze holesterola. Specifično nakupljanje  $A\beta$  u krvnim sudovima mrežnjače pokazano kod AB nastaje usled povećane transcitoze i disfunkcionalnog glimfatičkog sistema. Kratkotrajni tretman (3 nedelje) visokim dozama RU je ispoljio snažan protektivni efekat na propustljivost KMrB i doveo do značajnog smanjenja akumulacije  $A\beta$  na krvnim sudovima mrežnjače (za 22%).

Dobijeni rezultati pokazuju da tretman visokim dozama RU može imati protektivni efekat na funkciju KMrB i ukazuje na potencijal RU u adjuvantnim i profilaktičkim terapijama u cilju jačanja krvnih sudova.

Ključne reči: mrežnjača, MPE, starenje, Alchajmerova bolest, holesterol, transcitoza, glimfatički sistem, riblje ulje

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Neurobiologija

# **The effect of fish oil treatment on cholesterol metabolism in mouse retina during physiological aging and in Alzheimer's disease model**

## **Abstract**

The retina is the only part of the central nervous system (CNS) that can be directly analyzed by non-invasive methods, and early changes in the retina can indicate neurodegenerative changes in the brain. Given that aging is one of the major risk factors for Alzheimer's disease (AD), a better understanding of age-related changes in the retina may have great diagnostic potential.

Cholesterol plays an important role in the aging process, and in AD it regulates the toxicity of amyloid-beta ( $A\beta$ ) and affects the permeability of the blood-retinal barrier (BRB). That is why maintaining proper cholesterol homeostasis is extremely important. Supplementation with high doses of fish oil (FO) can significantly affect cholesterol homeostasis as well as delay the onset of AD symptoms.

These studies aimed to indicate the specific changes that occur in the retina during physiological and pathological aging. In addition, the therapeutic effect of short-term treatment with high doses of FO in the presymptomatic phase of AD was also evaluated. These changes were examined in the retinal pigment epithelium (RPE) of wild-type female mice (B6SJLF1 mice) and the 5XFAD animal model AD. Also, the changes in blood vessels that occurred after the accumulation of  $A\beta$  in aging as well as after FO treatment were investigated.

Given that cholesterol metabolism is attenuated in the retina, as well as in the brain of 5XFAD mice, FO treatment did not show a significant effect on the regulation of cholesterol homeostasis. The specific accumulation of  $A\beta$  in retinal blood vessels shown in AD is due to increased transcytosis and a dysfunctional glymphatic system. Short-term treatment (3 weeks) with high doses of FO exerted a strong protective effect on BRB permeability and led to a significant reduction of  $A\beta$  accumulation in retinal blood vessels (by 22%).

The obtained results show that treatment with high doses of FO can have a protective effect on BRB function and indicate the potential of FO in adjuvant and prophylactic therapies aimed at strengthening blood vessels.

**Keywords:** retina, retinal pigment epithelium, aging, Alzheimer's disease, cholesterol, transcytosis, glymphatic system, fish oil

Research area: Biology

Research field: Neurobiology

## SKRAĆENICE:

AB – Alchajmerova boleŝt

ABCA1 – transportna ATPaza ABCA1 tipa (eng. atp-binding protein cassette 1)

A $\beta$  – amiloid beta

AdipoR1 – adiponektinski receptor 1 (eng. adiponectin receptor 1)

AK – arahidonska kiselina

ALK – alfa-linolna kiselina

*ApoE* – apolipoprotein E

APP – amiloid prekursorski protein

CAA – cerebralna amiloidna angiopatija

CNS – centralni nervni sistem

*Cyp27* – porodica citohrom P450, podporodica 27 (eng. cytochrome P450 family 27 subfamily)

*Cyp46* – porodica citohrom P450 podporodica 46 (eng. cytochrome P450, family 46)

*Dct* – dopahrom tautomeraza (eng. dopachrome tautomerase)

DHK – dokozaheksanoinska kiselina

DPK – dokozapentanoinska kiselina

EPK – eikozapentanoinska kiselina

ERG – elektroretinogram

FAD – familijarna Alchajmerova boleŝt (eng. familial Alzheimer's disease)

FS – fotoreceptorski sloj

GĆS – ganglijski ćelijski sloj

GFAP – glijski fibrilarni kiseli protein (eng. glial fibrillary acidic protein)

GLK – gama linolna kiselina

HMGCR – 3-hidroksi-3-metil-CoA-reduktaza (eng. 3-hidroksi-3methyl-CoA reductase)

KMB – krvno-moždana barijera

KMrB – krvno-mrežnjaćna barijera

LDL – lipopartikule male gustine (eng. low density lipoparticles)

*Lhx2* – lim-homeoboks protein 2 (eng. lim-homeobox protein 2)

LK – linolna kiselina

*Lxr $\beta$*  – jetreni receptor X  $\beta$  (eng. liver x receptor  $\beta$  beta)



MFSD2A – D2A transporter MFS nadporodice (eng. main facilitator superfamily domen-containing protein 2A)

MG – Milerova glija

MK – masne kiseline

MNMK – mononezasićene masne kiseline

MPE – pigmenti epitel mrežnjače (eng. retinal pigment epithelium)

OCT – optička koherentna tomografija (eng. optical coherence tomography)

OTX2 – ortodontikularni homeoboks 2 protein (eng. ortodenticle homeobox protein 2)

pERG – elektroretinogram

PBS – fosfatom fosforilisan fiziološki rastvor (eng. *phosphate-buffered saline*)

PNMK – polinezasićene masne kiseline

PSEN – presenilin

PVDF – polivinildefluoridne membrane

RAA – retinalna amiloidna angiopatija

*Rpe65* – retinalni epitel-vezujući protein 65 (eng. retinal pigment epithelium-binding protein 65)

*Rbp1* – retinol-vezujući protein 1 (eng. retinol-binding protein 1)

*Rdh5* – 11-cis retinol dehidrogenaza 5 (11-cis retinol dehydrogenase 5)

*Rgr* – retinalni receptor spregnut sa G proteinom (eng. retinal G protein coupled receptor)

*Rlbp1* – retinaldehid-vezujući protein 1 (eng. retinaldehid-binding protein 1)

SDS – PAGE – sodium dodecil sulfat-poliakrilamidna gel elektroforeza (eng. sodium dodecyl sulfate-polyacrilamide gel electrophoresis)

SMD – staračka makularna degeneracija

Smi31 – antitelo na fosforilisanu subjedinicu neurofilamenta velike molekulske mase (NF-H) neurofilamenata

SNS – spoljašnji nuklearni sloj

Sox9 –SRY-vezan HMG boks transkripcioni faktor 9 (eng. SRY-related HMG boxtranscription factor 9)

SPH – sinaptofizin

SPS – spoljašnji pleksiformni sloj

Sreb1-c – sterol regulatorni element-vezujući protein 1 (eng. sterol regulatory element-binding protein 1-c)

SS – spoljašnji segmenti fotoreceptora

TBS – Tris-puferisani boratni rastvor (eng. Tris-HCL Buffered Saline)

*Tyr1* – tirozinaza 1

*TyrP1* – tirozinaza-vezujući protein 1 (eng. tyrosinase-binding protein 1)

UNS – unutrašnji nuklearni sloj

UPS – unutrašnji pleksiformni sloj

VC – vizuelni ciklus

# SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Građa oka - mrežnjača i pigmentni epitel mrežnjače (MPE).....	1
1.2. Uloga i značaj lipida u mrežnjači.....	3
1.2.2. Polinezasićene masne kiseline u mrežnjači.....	6
1.3. Mrežnjača tokom fiziološkog i patološkog starenja.....	8
1.3.1. Fiziološko starenje oka .....	8
1.3.2. Patološko starenje – Alchajmerova bolest (AB) .....	8
1.3.2.1. Animalni model Alchajmerove bolesti – 5XFAD transgeni miševi .....	9
1.4. Holesterol tokom fiziološkog i patološkog (Alchajmerova bolest) starenja .....	9
1.5. Lipidi i krvni sudovi mrežnjače .....	10
1.5.1. Promene u krvnim sudovima u oku i CNS-u u Alchajmerovoj bolesti.....	11
1.6. Lipidi u pigmentnom epitelu mrežnjače .....	12
1.6.1. Vizuelni ciklus retinala u pigmentnom epitelu mrežnjače .....	12
1.7. Suplementacija nezasićenim masnim kiselinama .....	13
1.7.1. DHK receptori/transporteri u mrežnjači.....	14
1.7.2. Efekat ribljeg ulja na transcitozu .....	15
1.7.3. Efekat suplementacije ribljim uljem na glimfatički sistem.....	15
1.8. Efekat suplementacije ribljim uljem na homeostazu holesterola.....	16
2. CILJEVI .....	17
3. MATERIJAL I METODE .....	18
3.1. Etička izjava.....	18
3.2. Eksperimentalne životinje.....	18
3.3. Određivanje genotipa .....	19
3.4. Eksperimentalne grupe i dizajn eksperimenta.....	19
3.5. Sakupljanje uzoraka .....	20
3.6. Kvantitativna polimerazna lančana reakcija u realnom vremenu (qRT-PCR).....	21
3.6.1. Izolacija RNK i reverzna transkripcija.....	21
3.6.2. Kvantitativni PCR u realnom vremenu (qRT-PCR) .....	22
3.7.1. Elektroforetsko razdvajanje proteina na poliakrilamidnom gelu .....	23
3.7.2. Prenos proteina sa SDS-poliakrilamidnog gela na membranu.....	24
3.7.3. Imunološka detekcija imobilizovanih proteina .....	24
3.7.4. Semikvantitativna analiza imunoblotova .....	25
3.8. Imunohistohemijska analiza.....	25
3.8.1. Statistička analiza imunobojenja krvnih sudova .....	25
3.9. Statistička analiza.....	26
4. REZULTATI.....	27

I DEO.....	27
4.1. Promene u mrežnjači u fiziološkom i patološkom starenju .....	27
4.1.1. Analiza ćelijskih markera u mrežnjači u fiziološkom i patološkom starenju.....	27
4.1.2. Ekspresija amiloida $\beta$ u mrežnjači tokom fiziološkog i patološkog starenja .....	28
4.1.3. Promene ekspresije gena uključenih u metabolizam holesterola u mrežnjači .....	30
4.1.4. Ekspresija MFSD2A tokom fiziološkog i patološkog starenja .....	31
4.1.5. Ekspresija AQP4 u mrežnjači tokom fiziološkog i patološkog starenja .....	33
4.1.7. Efekti fiziološkog i patološkog starenja na ekspresiju gena uključenih u metabolizam holesterola i gena vizuelnog ciklusa u MPE-u.....	35
4.1.8. Ekspresija gena vizuelnog ciklusa u MPE-u tokom starenja .....	36
4.2. REZULTATI II DEO.....	38
4.2.1. Promene u mrežnjači tokom tretmana ribljim uljem.....	38
4.2.3. Efekat tretmana ribljim uljem na ekspresiju gena koji regulišu metabolizam holesterola u MPE-u .....	39
4.2.4. Efekti tretmana visokim dozama ribljim uljem na transportere DHK i gene vizuelnog ciklusa u MPE-u.....	41
4.2.4.1. Ekspresija DHK transportera u MPE-u pod tretmanom ribljim uljem.....	41
4.2.4.2. Promene ekspresije gena vizuelnog ciklusa retinala u MPE-u pod tretmanom ribljim uljem .41	
4.2.5. Tretman ribljim uljem menja ekspresiju <i>Mfsd2a</i> iRNK i MFSD2A proteina u mrežnjačama divljeg soja i 5XFAD miševa.....	44
4.2.6. Tretman ribljim uljem menja zastupljenost AQP4 u mrežnjačama divljeg soja i 5XFAD miševa .....	45
4.2.7. Ekspresija amiloida $\beta$ u mrežnjači pod tretmanom riblim uljem kod 5XFAD .....	47
5. DISKUSIJA .....	49
5.2. Promene u homeostazi metabolizma holesterola u fiziološkom i patološkom starenju kao i nakon tretmana ribljim uljem.....	50
5.3. Promene u krvnim sudovima mrežnjače u fiziološkom i patološkom starenju kao i nakon tretmana ribljim uljem.....	51
5.4. Promene u MPE-u u fiziološkom i patološkom starenju kao i nakon tretmana ribljim uljem .....	54
6. ZAKLJUČCI.....	57
7. LITERATURA.....	59
BIOGRAFIJA AUTORA.....	78

# 1. UVOD

Mrežnjača se razvija iz primarnog embrionalnog meška - prosencefalona tokom treće nedelje gestacije (Ludwig i sar., 2023). Imajući u vidu da se od istog dela nervne cevi formiraju telencefalon i talamus sa talamičkim strukturama, postoje brojne anatomske i fiziološke sličnosti između mrežnjače i mozga u pogledu tipova ćelija, vaskulature i krvnih barijera. Važna karakteristika mrežnjače je da je jedini deo centralnog nervnog sistema (CNS-a) koji se može direktno analizirati neinvazivnim metodama. Shodno tome, mrežnjača može da se posmatra kao „prozor” u CNS. Štaviše, rane promene neophodne da se ustanove specifične neurološke bolesti se lako otkrivaju baš u mrežnjači (Kumar, 2018). Zbog brojnih sličnosti između patologija oka i mozga, koje su primećene kod Alchajmerove bolesti (AB), glaukoma i staračke makularne degeneracije (SMD), možemo da zaključimo da bi promene u mrežnjači mogle da se koristi kao biomarkeri kako u postavljanju dijagnoze, tako i kod praćenja napretka ovih bolesti i u proveru efikasnosti različitih tretmana. Zato mrežnjača predstavlja jedinstven model za opservaciju i ispitivanje neuronskih struktura i patologija. (Jerotić i Marić, 2018; Silverstein i Rosen, 2015; Sivak, 2013).

## 1.1. Građa oka - mrežnjača i pigmentni epitel mrežnjače (MPE)

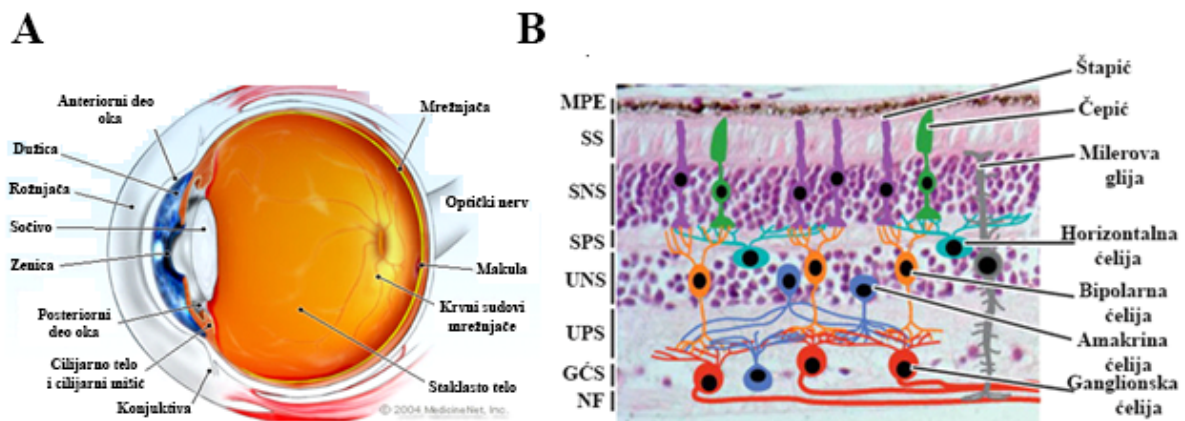
Glavna uloga mrežnjače je da elektromagnetnu energiju svetlosti transformiše u akcione potencijale, koji se aksonima ganglijskih ćelija u sastavu optičkog nerva prenose do specifičnih centara u mozgu, na osnovu kojih se stvara svest o svetlu oko sebe i sinhronizuju aktivnosti somatskog i autonomnog nervnog sistema sa događajima u okruženju (Forrester i sar., 2015). Oko sisara se nalazi na prednjoj orbiti, bliže lateralnom zidu i orbitalnom krovu i sastoji se iz četiri celine: 1. sloj rožnjače i sklere, 2. uvealni trakt koji se sastoji od horoida, cilijarnog tela i dužice, koji imaju metaboličku ulogu, 3. nervni sloj (mrežnjača, eng. *retina*,) i 4. pigmentni epitel mrežnjače (MPE), koji predstavlja vid spoljašnje krvno-mrežnjačne barijere (KMrB) (Forrester i sar., 2015) (Slika 1 A).

U odnosu na ulazni smer svetlosti ćelije mrežnjače su raspoređene u slojeve: sloj ganglijskih ćelija (GĆS), unutrašnji pleksiformni sloj (UPS), unutrašnji nuklearni sloj (UNS), spoljašnji pleksiformni sloj (SPS), spoljašnji nuklearni sloj (SNS) i fotoreptorski sloj (FS). SNS i UNS slojevi sadrže tela fotoreptorskih, odnosno, bipolarnih neurona, a razdvojeni su pleksiformnim slojevima (SPS i UPS) u kojima se nalaze dendriti ganglijskih ćelija i ćelija nuklearnih slojeva (Slika 1 B).

Mrežnjača se sastoji od pet osnovnih tipova neurona - fotoreptorske, bipolarne, ganglijske, horizontalne i amakrine ćelije kao i glijskih ćelija - Milerove ćelije (MG): astrociti i mikroglia (Slika 1 B). Fotoreptori se sastoje od čepića i štapića, a čepići su podeljeni u dva (kod primata tri) spektralna tipa u odnosu na njihov maksimum apsorpcije talasnih dužina. Oni se nalaze u spoljašnjem sloju mrežnjače. Štapići omogućavaju razlikovanje kontrasta, svetlosti i kretanja, dok su čepići odgovorni za konačnu i prostornu rezoluciju, kao i vid u boji (Potic, 2018). Mrežnjača ljudi sadrži makulu, koja predstavlja mali deo mrežnjače koji je odgovoran za centralni vid i ima najveću koncentraciju fotoreptora u mrežnjači. Iako glodari nemaju makulu, struktura njihove mrežnjače je jako slična mrežnjači kod ljudi, pa predstavljaju dobar model sistem za izučavanje bolesti mrežnjače (Chen i sar., 2014). Fotoreptori ostvaruju sinaptički kontakt sa bipolarnim ćelijama koje dalje prave sinapse sa ganglijskim ćelijama u nivou UPS. Postoji preko deset tipova bipolarnih ćelija, koje učestvuju u ciklusima obnove čepića i štapića. Ima više od 20 tipova amakrinih ćelija, dva tipa horizontalnih (Yan i sar., 2020) i bar 10 različitih subtipova ganglijskih ćelija. Ganglijske

ćelije su morfološki (Bazan i Rodriguez de Turco, 2003; Jerotić, 2022) gledano najveći neuroni mrežnjače. Čelije MG su glijske ćelije koje su karakteristične isključivo za mrežnjaču i predstavljaju najbrojnije glijske ćelije u mrežnjači. Astrociti su koncentrisani u GČS, i imaju dosta sličnosti sa ćelijama MG (Yan i sar., 2020).

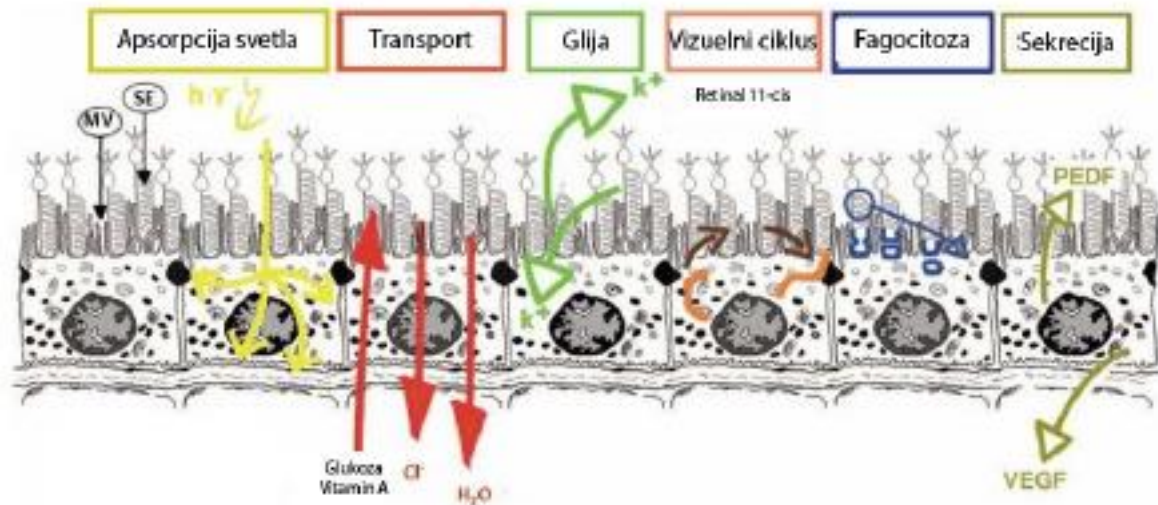
Sve neuronalne ćelije mrežnjače učestvuju u procesima obrade i transdukcije svetlosnih signala u električne i akcione potencijale, koji se prenose do vizuelnih centara u mozgu. Fotoreceptori ostvaruju sinaptički kontakt sa bipolarnim ćelijama, dok bipolarne ćelije dalje prave sinapse sa ganglijskim ćelijama u nivou UPS. Horizontalne, bipolarne i amakrine ćelije u UNS su odgovorne za obradu signala, kao i prenošenje signala do GČS. Aksoni GČS izgrađuju kranijalni (optički) nerv, kojim se informacije iz mrežnjače prenose do mozga (Kolb i sar., 2003, Sancho-Pelluz i sar., 2008).



**Slika 1.** Struktura oka i mrežnjače. (A) Šematski dijagram ljudskog oka (B) Struktura mrežnjače miša sa slojevima i ćelijama tipovima. Spoljašnji segmenti (SS) fotoreceptora su okrenuti prema mrežnjačno pigmentnom epitelu (MPE), dok se njihova ćelijska tela nalaze u okviru spoljašnjeg nuklearnog sloja (SNS). Unutrašnji nuklearni sloj (UNS) sadrži ćelijska tela horizontalnih, bipolarnih, amakrinih ćelija i ćelija Milerove glije. Ganglijski ćelijski sloj (GČS) sadrži ćelijska tela ganglijskih ćelija i između amakrinih ćelija. Sinapse između fotoreceptora, bipolarnih i horizontalnih ćelija se nalaze u spoljašnjem pleksiformnom sloju (SPS), dok se sinapse između bipolarnih, ganglijskih i amakrinih ćelija nalaze u unutrašnjem pleksiformnom sloju (UPS). Aksoni ganglijskih ćelija (GČ) formiraju sloj nervnih vlakana (NF) koji ulaze u sastav optičkog nerva (Prerađeno iz Basset i Wallace, 2012). Za precizan pregled strukture mrežnjače i njene citoarhitekture pogledati <http://webvision.med.utah.edu/>.

MPE je vid spoljašnje KMrB koji se naslanja na spoljašnje segmente (SS) fotoreceptora i sastoji od polarizovanih epitelni ćelija koje se nalaze između mrežnjače i horiokapilarnih krvnih sudova. (Forrester i sar. 2015; Bok, 1993). MPE je izuzetno važan za normalno funkcionisanje fotoreceptorskih ćelija i proces viđenja zbog svojih metaboličkih i transportnih uloga (Slika 2). Ova bliska anatomska veza između MPE-a i fotoreceptora s jedne strane i MPE-a i horiokapilara sa druge, omogućava MPE-u da obezbedi nutrijente i kiseonik fotoreceptorskim ćelijama kao i da reguliše eliminaciju metaboličkog otpada koji nastaje od strane mrežnjače, s obzirom na to da se svakodnevno obnavlja skoro 10% SS fotoreceptora. Čelije MPE-a su polarizovane, i imaju bazolateralne i apikalne površine. Na svojoj bazolateralnoj strani su povezane trodimenzionalnom mrežom čvrstih veza (eng. *tight junctions*, TJ) koja formira fizičku, selektivno propustljivo barijeru između mrežnjače i horoida. Izuzetno važna funkcija MPE-a je regeneracija vizuelnih pigmenata (Sancho-Pelluz i sar., 2008) putem fagocitoze SS, posebno štapića, i u manjoj meri čepića (Forrester i sar.,

2015) koja se odvija kroz seriju enzimatskih reakcija poznatoj pod nazivom vizuelni ciklus retinala.



Slika 2. Sumirane funkcije MPE-a. (Modifikovano iz Straus, 2015).

## 1.2. Uloga i značaj lipida u mrežnjači

Nakon otkrića prvog biološki aktivnog lipida, aktivirajućeg faktora trombocita, 1979. godine (Honda i sar., 2002) pokazano je da su lipidi, pored njihove osnovne funkcije kao izvora energije i blokova za izgradnju membrana, izuzetno važni biološki aktivni molekuli sa različitim ulogama u funkcionisanju organizma (Zähringer i sar., 1999). Kontinuirano recikliranje membrana fotoreceptora (Ana i sar., 2023; Young, 1967) zahteva veliku količinu energije. Biohemijske i histohemijske analize su pokazale da postoje razlike u odnosu lipida u različitim strukturama mrežnjače. U MPE-u je zastupljenost lipida čak tri puta veća nego u mrežnjači (Nolan i sar., 2021).

Sastav lipida u mrežnjači je jedinstven i igra ključnu ulogu u funkcijama mrežnjače. Najzastupljeniji lipidi u mrežnjači su holesterol i polinezasićene masne kiseline (PNMK), prvenstveno dokozaheksanoinska kiselina (DHK) (Rotstein i sar., 1996). Holesterol čini oko 2% mase mrežnjače i SS ili 10% ukupnih lipida u membranama SS (Fliesler i sar., 2010) dok DHK čini približno 80% sadržaja membrane diskova SS i 5% membrana SS, što ukazuje na različit sadržaj lipida u mikroregijama fotoreceptorskih ćelija.

U SS fotoreceptora se odvija transdukcija svetlosne energije u neuronalne signale. SS su organizovani u diskove, u kojima je visoka koncentracija fotopigmenta rodopsina. Rodopsin je član superfamilije G - receptora spregnutih sa proteinom. On ima svoj ligand koji apsorbuje svetlost i naziva se retinaldehid. Vezani oblik retinaldehida, 11-*cis* retinal, deluje kao moćan antagonist, držeći rodopsin u potpuno neaktivnom stanju. Apsorpcija fotona svetlosti izomerizuje hromofom u drugu formu, *trans*-konfiguraciju, koja deluje kao moćan agonist i brzo dodovi do konformacione promene proteina, aktivirajući rodopsin (Lamb i sar., 2006). Poremećena homeostaza lipida u membranama SS utiče na fluidnost membrane (Querques i sar., 2011) i na pravilno odvijanje procesa fototransdukcije (Litman i sar., 2001; Querques i sar., 2011). Postoje dokazi da su za pravilno funkcionisanje rodopsina neophodne ogovarajuće interakcije lipida i proteina koje utiču na njegovu strukturu i prelazak iz neaktivnog u aktivno stanje (Salas-Estrada i Leslie, 2018). Naime, zato je održavanje

lipidne homeostaze ključno za pravilno funkcionisanje rodopsina. Iz svega navedenog možemo zaključiti da je lipidni sastav membrane fotoreceptora ključan za vizuelnu transdukciju i poremećaji lipidne homeostaze mogu da dovedu do vizulene disfunkcije i slepila (Jastrzebska i sar., 2011). Pokazano je da se zastupljenost i količina lipida u oku menja tokom starenja (Vollmer-Snarr i sar., 2006) i u različitim patologijama (Gabrielle, 2022).

### 1.2.1. Holesterol u mrežnjači

Održavanje stabilnog nivoa i distribucije holesterola u mrežnjači je neophodno za održavanje normalne strukture i funkcije mrežnjače. Ovo se postiže putem održavanja pravilne homeostaze holesterola tj. ravnoteže između lokalne sinteze holesterola, unosa lipoproteina iz drugih izvora (npr. iz krvi), i eliminacije holesterola iz mrežnjače (u krv) (Fliesler i sar., 2010).

Mrežnjača obezbeđuje holesterol putem lokalne biosinteze (72-78%), kao i preuzimanjem iz krvi (22-28%), i u ćelijama mrežnjače se ekspimiraju svi geni koji su neophodni za nezavisnu homeostazu holesterola (Fliesler i sar., 1993). Nivoi holesterola u ćelijama mrežnjače su regulisani homeostatskim mehanizmima koji balansiraju puteve ulaska i izlaska holesterola iz ćelije (Brown i Goldstein, 2009). Putevi ulaska holesterola u ćeliju mrežnjače su velikim delom regulisani pomoću sterol regulatornih element-vezujućih proteina (eng. sterol regulatory element-binding protein, SREBP) koji ostaju kao prekursori u endoplazmatičnom retikulumu kada su nivoi holesterola u ćeliji visoki (Horton i sar., 2002). Izlazak holesterola iz ćelije je regulisan pomoću dva puta: izbacivanje holesterola pomoću transportne ATPaza ABCA1 tipa (eng. atp-binding protein cassette 1, ABCA1), kao i pomoću oksisterola iz porodice citohrom P450 (eng. cytochrome P450). U tkivu mrežnjače zastupljeni su citohromi iz porodica 27 i 46 (eng. cytochrome P450 family 27 subfamily 46). Oksisteroli aktiviraju jetreni receptor X  $\beta$  (eng. liver x receptor  $\beta$ , *Lxr $\beta$* ) u putu biosinteze holesterola, koji onda utiče na *Abca1* i na apolipoproteine koji su uključeni u uklanjanje holesterola iz ćelije (npr. apolipoprotein E, *ApoE*) (Repa i Mangelsdorf, 2000). Takođe, LXR $\beta$  kontroliše ekspresiju *Sreb* izoforme *Srebp1-c*, koja pojačava aktivaciju ekspresije gena uključenih u sintezu masnih kiselina (Horton i sar., 2002). Možemo da zaključimo da postoji koordinisana regulacija puteva ulaska i izlaska holesterola iz ćelije. Mehanizam eliminacije holesterola iz mrežnjače pored aktivnosti *Cyp27* i *Cyp46*, uključuje i fagocitozu fotoreceptora pomoću MPE-a (Pikuleva i Curcio, 2014). U mozgu je predominantna forma citohroma *Cyp46*, dok se u mrežnjači dominantno ekspimirira *Cyp27*. U mrežnjači, za razliku od mozga, gde eliminaciju holesterola obavljaju isključivo neuroni, ne postoje specifični tipovi ćelija koji učestvuju u eliminaciji holesterola već se citohromi ekspimiraju u svim slojevima mrežnjače (Zheng i sar., 2012). Takođe je važno je napomenuti da delecija ključnih enzima uključenih u katabolizam holesterola (CYP27 i CYP46) dovodi do vaskularnih abnormalnosti u oku ukazujući na intimnu vezu između homeostaze holesterola i mikrovaskulature mrežnjače (Saadane i sar., 2014). Pored toga, nedostatak ekspresije CYP27 i CYP46 kod miševa dovodi do disfunkcije mrežnjače već u uzrastu od tri meseca starosti. Ovo pokazuje važnost pravilnog odvijanja eliminacije holesterola iz ćelija mrežnjače za očuvanje strukture i funkcije mrežnjače (Saadane i sar., 2014).

Holesterol je distribuiran u svim slojevima mrežnjače (Zheng i sar., 2012). HMGCR, glavni ograničavajući enzim sinteze holesterola, se ekspimirira u različitim slojevima mrežnjače, najviše u SNS, UNS i GČS. U manjoj meri se ekspimirira u unutrašnjim segmentima fotoreceptora, UPS i SPS, kao i MPE-u. Ekspresija SREBP1-C, još jednog od

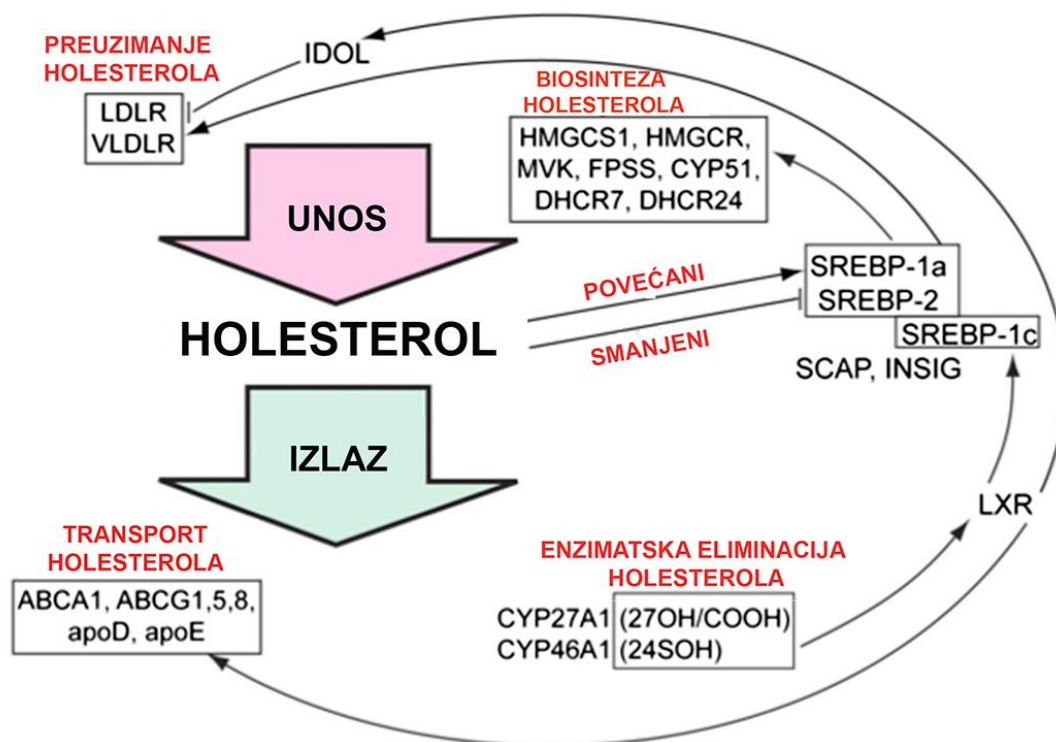


regulatora sinteze holesterola, kolokalizuje sa ekspresijom HMGCR (Tserentsoodol i sar., 2006). ABCA1, regulator transporta holesterola iz ćelije, se dominantno eksprimira u GČS, MPE-u, kao i u US fotoreceptora. LXR $\beta$ , glavni regulator ulaska i izlaska holesterola iz ćelije, se eksprimira dominantno u fotoreceptorima i GČS.

Metabolizam holesterola u mrežnjači se razlikuje od ostatka CNS-a. Iako je mrežnjača deo CNS-a, pokazano je da steroli lako prelaze iz lipoproteina iz krvi u MPE i u sve slojeve neuralne mrežnjače (Petrov i sar., 2019). Skoro sav holesterol u mozgu potiče od *de novo* sinteze, od kojih je većina iskorišćena za proizvodnju mijelina (Björkhem i Maneau, 2004). Nasuprot ovome, holesterol u mrežnjači potiče dobrim delom iz krvi (Duncan, 2009). Krvni sudovi mrežnjače sadrže fenestrirane kapilare koji su visoko propustljivi za molekule malih molekulskih težina. Jedan od primera koji to pokazuju je podatak da pacovi koji konzumiraju hranu bogatu holesterolom imaju značajno povišene nivoe holesterola u mrežnjači (Vidal i sar., 2019). MPE izlučuje lipoproteinske partikule u matriks pomoću ABCA1 transportera. Holesterol i drugi lipidi se kreću između MPE i fotoreceptorskih ćelija (i spoljašnjih i unutrašnjih segmenata), i između Milerove glije i fotoreceptora. MPE takođe može da eksportuje holesterol (i njegove oksisterolne derivate) u formi partikula u cirkulaciju horoida, održavajući na ovaj način homeostazu holesterola (Ramachandra Rao i Fliesler, 2021). Na Slici 3 možemo videti šematski prikaz razmene i transporta holesterola u mrežnjači.

Zbog visokog sadržaja holesterola u njihovim SS fotoreceptori su posebno pogođeni promenama u homeostazi holesterola. U SS postoji gradijent holesterola, sa više holesterola u bazi (bliže unutrašnjim segmentima) nego u distalnom kraju (bliže MPE) (Albert i Boesze-Battaglia, 2005). Poznato je da holesterol ima ulogu u nastanku patologija nervnog sistema koje nastaju sa starenjem, kao što su AB, glaukom, staračka makularna degeneracija (SMD), Smit-Lemli-Opitzov sindrom, Neiman-Pikova bolest tipa C (Léger-Charnay i sar., 2022; Orth i Bellosta, 2012). Različite bolesti pogađaju različite metaboličke puteve – biosintezu i transport holesterola, kao i obradu lipoproteina (Varma i sar., 2021). Posebno je važna uloga holesterola u nastanku patologije AB jer je holesterol uključen u proces obrade i produkcije toksičnog A $\beta$ . Uloga holesterola u nastanku kardiovaskularnih oboljenja je takođe dobro poznata (Jung i sar., 2022), pa je ispitivana i uloga lekova uključenih u snižavanje nivoa holesterola na nastanak ovih oboljenja. Međutim, studije koje ispituju vezu između lekova uključenih u snižavanje nivoa holesterola i nastanka horiomrežnjačnih bolesti su nepotpune.

Pokazana je i povezanost između ekspresije gena vizuelnog ciklusa sa metabolizmom holesterola tako što ekspresija retinalnog epitelnog-vezujućeg proteina 65 (eng. retinal pigment epithelium-binding protein 65, *Rpe65*) može biti povećana pomoću *Lxr $\beta$*  agonista, T09. S obzirom na to da su potrebne visoke doze T09 za povećanje ekspresije *Rpe65*, to ukazuje na indirektnu regulaciju pomoću *Lxr $\beta$* . Poznato je i da povećan sadržaj holesterola inhibira aktivaciju rodopsina, pa bi povećanje ekspresije *Rpe65* pomoću T09 agonista mogao da bude mehanizam za očuvanje funkcije rodopsina kao odgovor na povećanje holesterola u mrežnjači. Holesterol inhibira rodopsin indirektno, remećenjem organizacije lipidnog dvosloja ili ograničavajući sposobnost membrane da se podvrgne konformacionim promenama lipidnog dvosloja (Albert i Boesze-Battaglia, 2005).



**Slika 3.** Šematski prikaz sinteze, transporta i eliminacije holesterola u mrežnjači kičmenjaka HMGCR, 3-hidroksi-3-metilglutaryl-CoA reduktaza, ograničavajući enzim u sintezi holesterola; LDLR i CD36, receptori koji prepoznaju lipoproteine male gustine; LXR, jetreni receptor  $X\beta$ , transkripcijski faktor koji inhibira ekspresiju LDLR i aktivira ekspresiju SREBP1 i ABCA1; SREBP, SCAP i Insig, proteini koji aktiviraju ekspresiju HMGCR i LDLR proteina; CYP27A1 i CYP46A1 porodica citohrom P450, podporodica 27 i 46 koji metabolišu holesterol u 27-hidroksiholesterol (27OH) i 24-hidroksiholesterol (24OH); ABCA1, protein iz grupe atp-vezujuće kasete i koji reguliše izbacivanje holesterola iz ćelije. (Modifikovano iz Zheng i sar., 2012)

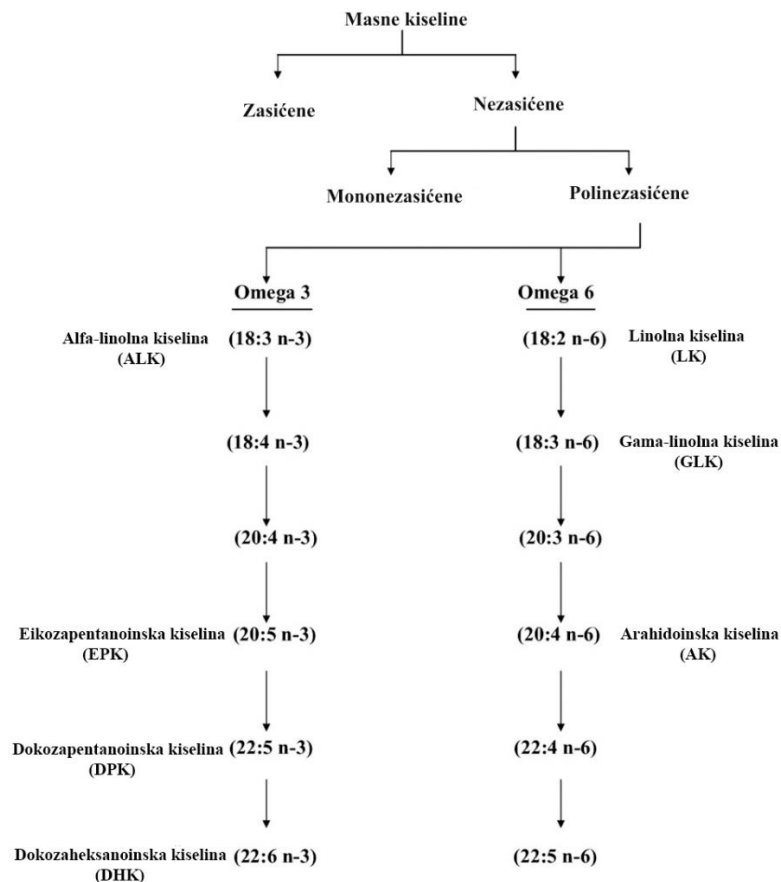
### 1.2.2. Polinezasićene masne kiseline u mrežnjači

Polinezasićene masne kiseline pokazuju anti-angiogeni, anti-vazoproliferativni efekat i neuroprotektivni efekat u patološkim procesima koji dovode do proliferativnih i degenerativnih bolesti mrežnjače (SanGiovanni i Chew, 2005). Ovi procesi se aktiviraju u odgovoru na ishemiju, izlaganje svetlu, oksidativni stres, apoptozu, ćelijske signalne puteve, inflamaciju i razvojne procese asocirane sa starenjem (Saccà i sar., 2018). PNMK deluju pomoću kompleksnih sistema koji uključuju eikozanoide, angiogenetske faktore, matriksne metaloproteinaze, reaktivne vrste kiseonika, ciklične nukleotide, neurotransmitere i neuromodule, proinflamatorne i imunoregulatorne citokine i inflamatorne fosfolipide (Reiss i sar., 2011).

Dve najvažnije grupe PNMK su omega-3 i omega-6 masne kiseline (MK) (Slika 4). MK ulaze u sastav lipida koji izgrađuju fosfolipidni dvosloj membrane, te su neophodne za razviće i funkciju ćelijskih membrana mozga, mrežnjače, kao i drugih neuronalnih tkiva. Dominantnu klasu PNMK u mrežnjači predstavljaju fosfolipidi, koji sadrže veliku količinu omega-3 i omega-6, neophodnih za pravilan razvoj i funkciju mrežnjače. Fosfatidilholin i fosfatidilserin predstavljaju aminofosfolipide u kojima je najprisutnija DHK. Fosfatidilholin

čini 40-50% fosfolipida u mrežnjači, dok fosfatidilserin predstavlja 30-35% fosfolipida mrežnjače. Fosfatidilinozitol čini 3-6% lipida mrežnjače i u njemu je najprisutnija MK arahidonska kiselina (Bazan i Rodriguez de Turco, 2003). Fosfatidilinozitol ulazi u sastav domena membrana koji je uključen u brojne signalne kaskade (SanGiovanni i Chew, 2005).

Nezasićene MK, prvenstveno dokosaheksanoična kiselina, su prisutnije u mrežnjači nego u bilo kom drugom tkivu organizma (van Kuijk, 1991), čineći 50-60% SS. Omega-3 PNMK utiču na ćelijsku ekspresiju gena u mrežnjači, ćelijsku diferencijaciju i ćelijsko preživljavanje (SanGiovanni i Chew, 2005). DHK je ključna za optimalan nivo fluidnosti membrana i očuvanje integriteta fotoreceptora, mrežnjače, kao i vizuelne funkcije (Querques i sar., 2011). Time što utiče na biofizička svojstva membrana, DHK učestvuje i u regulaciji aktivacije rodopsina tokom procesa fototransdukcije (Brown, 1994; Litman i sar., 2001). Smanjena količina DHK smanjuje aktivnost rodopsina, dok prevelika količina DHK dovodi do spontane aktivacije rodopsina i time do degeneracije fotoreceptora (Querques i sar., 2011; Trenholm i Awatramani, 2015). To znači da je za adekvatno funkcionisanje fotoreceptora neophodno održavanje pravilne homeostaze DHK u membranama.



**Slika 4.** Metabolički putevi omega-3 i omega-6 sinteze masnih kiselina. Masne kiseline su klasifikovane kao zasićene ili nezasićene, u zavisnosti od prisustva dvostrukih veza. Nezasićene masne kiseline su dalje podeljene na mononezasićene i polinezasićene. PNMK se dalje dele na n-3 i n-6 masne kiseline. Linolna i alfa-linolna kiselina su prekursori n-3 i n-6 masnih kiselina, i dalje su konvertovane u različite PNMK dugog lanca procesom sekvencijalne desaturacije i elongacije (Modifikovano iz Harris, 2008).

### 1.3. Mrežnjača tokom fiziološkog i patološkog starenja

#### 1.3.1. Fiziološko starenje oka

Napredak moderne medicine je doprineo povećanju prosečnog životnog veka poslednjih decenija. Ipak, starenje je praćeno brojnim disfunkcijama koje pogađaju čitav spektar organa, uključujući i oko. Minorna odstupanja od normalne funkcije u bilo kom koraku ovog procesa mogu da imaju ogromne posledice na vizuelnu funkciju. Broj mukoznih ćelija konjunktive, kao i proizvodnja suza, se smanjuje sa starenjem, što može dovesti do sindroma suvog oka. Nagomilavanje soli kalcijuma i soli holesterola u rožnjači sa starenjem dovodi do stvaranja sivo-belog luka koji se naziva „stari luk” (*lat.* Arcus senilis) i utiče na normalan proces vida. Proteini u sočivu koji su nazvani kristalini gube prozračnost vremenom, što vodi katarakti, glavnom uzroku slepila širom sveta. Brojne bolesti mrežnjače se češće razvijaju sa starenjem, uključujući SMD, dijabetičnu retinopatiju i odvajanje mrežnjače (Garrity, 2022).

Procenjuje se da prevalenca pogoršanja vida kod osoba starijih od 65 godina varira od 4% do čak 20% (Salchi i sar., 2022), u zavisnosti od toga kako je poremećaj definisan. Stariji pacijenti sa slabim vidom često prijavljuju smanjen kvalitet života, simptome depresije i anksioznosti, naglašavajući važnost razvoja efektivnijih terapija za bolesti oka povezane sa starenjem.

#### 1.3.2. Patološko starenje – Alchajmerova bolest (AB)

Pored prirodnih posledica starenja postoji i patološko starenje koje podrazumeva nastanak neke od bolesti koje se javljaju u kasnijem životnom dobu. Jedna od najpoznatijih bolesti koja je povezana sa starenjem je AB. Ona predstavlja ireverzibilnu neurodegenerativnu bolest koju karakteriše progresivan gubitak kognitivnih sposobnosti i dalji poremećaji u ponašanju koji konačno dovode do gubitka sposobnosti obolelih da izvode najjednostavnije svakodnevne aktivnosti i vode brigu o sebi. AB predstavlja 60%-80% svih demencija u populaciji starijih osoba i procenjeno je da trenutno više od 55 miliona ljudi širom sveta, starijih od 65 godina, boluje od demencije čiji je uzrok AB (podaci svetske zdravstvene organizacije, engl. *World Health Organisation*). Većina slučajeva AB su sporadične forme koje se javljaju u kasnijem dobu, dok je manji broj slučajeva autozomalno dominantna AB (Tanzi, 2012).

Nove metode snimanja i otkrivanje molekularnih markera AB je omogućilo postavljanje dijagnoze AB u ranim stadijumima bolesti (Nordberg, 2015). Međutim, postavljanje definitivne dijagnoze se i dalje uglavnom zasniva na histopatološkoj analizi nakon smrti kao i na posrednim kliničkim nalazima i porodičnoj istoriji pacijenta. Pokazano je, međutim, i da klinička slika i neuropatološki nalazi prilikom autopsije često nisu isti, kao i da se senilne plake kao glavna histopatološka obeležja oboljenja mogu detektovati i kod osoba sa očuvanim kognitivnim sposobnostima. Sve ovo jasno ukazuje da je neophodno da se bolje okarakterišu postojeći biološki markeri kao i da se definišu novi. U zajedničkoj publikaciji Nacionalnog instituta za starenje SAD i Asocijacije za Alchajmerovu bolest postavljen je istraživački okvir u kome se predlaže da se termin AB prvenstveno odnosi na neuropatološke promene i da se AB definiše biomarkerima tokom života i prilikom autopsije, a ne kliničkim simptomima (Jack i sar., 2018).

Podaci iz kliničkih i animalnih studija ukazuju na to da mrežnjača može da posluži kao sredstvo za ranu dijagnostiku AB (Zhang i sar., 2021). Promene u oku AB pacijenata uključuju pad u vizuelnoj aktivnosti, osetljivosti na kontrast, razlikovanju boja, odgovoru na elektrotretinogramu (pERG), kao i poremećaje u vidnom polju. Vizuelni i morfološki deficit, koji uključuju smanjenje u pERG odgovoru, prisustvo nakupina A $\beta$  i tau klubadi u mrežnjači, smanjenje sloja nervnih vlakana u ganglijskom ćelijskom sloju, kao i reaktivnu gliozu, su pronađeni u različitoj meri kod različitih transgenih animalnih modela AB u različitoj meri (Koronyo i sar., 2017).

Međutim, korelacija između progresije patoloških i neurodegenerativnih promena u mrežnjači i mozgu nisu za sada u potpunosti razjašnjene. Primenom optičke koherentne tomografije primećene su i morfološke promene kao što su stanjivanje sloja u kome se nalaze aksoni ganglijskih ćelija i propadanje vaskulature mrežnjače (Chiquita i sar., 2019). Ova studija ukazuje na to da bi promene u vaskulaturi mrežnjače mogle da otkriju patološke promene u mozgu.

### **1.3.2.1. Animalni model Alchajmerove bolesti – 5XFAD transgeni miševi**

Jedan od često korišćenih transgenih animalnih modela AB jeste 5XFAD mišiji model, koji su razvili Oakley i saradnici (2006). Transgeni 5XFAD miševi koeksprimiraju pet mutacija koje su karakteristične za familijarnu AB (engl. *Familial Alzheimer Disease*, FAD). U pitanju su životinje kojima je u genom ubačena sekvenca sa mutiranim humanim genima za amiloid prekursorski protein (APP) i presenilin (PSEN) koji su pod kontrolom mišjeg Thy1 promotora. Od pet prisutnih mutacija, tri su u genima za APP (Swedish - K670N, M671L; Florida - I716V; London - V717I), dok su dve mutacije (M146L, L286V) prisutne u genu za PSEN1. Model je specifičan po tome što veoma rano razvija izraženu amiloidnu patologiju usled prekomerne produkcije A $\beta$ . Kod životinja starosti oko 1,5 meseci A $\beta$  se deponuje i agregira unutar tela neurona i njegovih nastavaka, dok se amiloidni plakovi javljaju već od drugog meseca i to pre svega u subikulumu, kao i u dubokim slojevima kore velikog mozga. Gubitak sinapsi i neurona nastupa znatno kasnije, oko 9. meseca starosti životinja (Oakley i sar., 2006; Kimura i Ohno, 2009). S obzirom da 5XFAD model karakteriše neurodegeneracija izazvana amiloidom, on se smatra relevantnim za bioheviornalne, biohemijske i strukturne promene koje odgovaraju AB kod humane populacije.

### **1.4. Holesterol tokom fiziološkog i patološkog (Alchajmerova bolest) starenja**

Alois Alchajmer je još 1907. godine ukazao na „lipoidne granule” kao treće obeležje AB (Zhao i sar., 2023). Mnoga biološka, epidemiološka i genetička istraživanja su fokusirana na vezu između metabolizma holesterola i AB (Frank i sar., 2008; Egawa i sar., 2016; Loera-Valencia i sar., 2019). Pokazano je da je nivo holestrola povećan 19-34% u svojoj masi moždane kore u AB (Xiong i sar., 2008; Lazar i sar., 2013). Postoje dokazi da se holesterol direktno vezuje za C99 fragment APP-a. Ovaj fragment je važan za razvoj patologije AB jer ga obrađuje  $\gamma$ -sekretaza, što dovodi do formiranja toksičnog fragmenta A $\beta$ . Vezivanje holesterola za ovaj fragment dovodi do ugrađivanja C99 fragmenta u domene membrane bogate holesterolom, koji su poznati kao lipidni pontoni. Na ovaj način holesterol utiče na favorizovanje amiloidogenog puta obrade APP-a pomoću  $\gamma$ -sekretaze (Langness i sar., 2021). Dugo se mislilo da je visok nivo holesterola u serumu faktor rizika za nastanak AB. Međutim, novija istraživanja pokazuju da zapravo nizak nivo holesterola faktor za nastanak AB.

Nedostatak holesterola je povezan sa poremećenom signalnom transdukcijom i sinaptičkom degradacijom. Studije su pokazale i smanjenje količine holesterola u mozgu kod obolelih od AB (Ledesma i sar., 2003; Egawa i sar., 2016). Ove razlike mogu da budu posledica različitih nivoa metabolizma holesterola u različitim delovima mozga u toku starenja kao i u toku neuropatoloških procesa. Međutim, nije samo povećanje ili smanjenje količine lipida bitno, nego i veličina promene. Malo smanjenje nivoa holesterola može da bude protektivno ali gubitak veći od 30% može da dovede do ćelijske smrti (Martin i sar., 2008). Pokazano je da su nivoi holesterola u mozgu kod 5XFAD niži za oko 60 % u odnosu na netransgene životinje (Zhang i sar., 2023).

Sve je više dokaza koji osporavaju korelacije između visokog nivoa holesterola u plazmi i AB (Bai i sar., 2022; Zhang i sar., 2023). Ova otkrića su dovela do formiranja nove hipoteze po kojoj sniženi nivoi holesterola dovodi do patologije asocirane sa AB i posledično do kognitivnog deficita. Studije su pokazale da je smanjeni nivo holesterola u plazmi uključen u regulaciju agregacije A $\beta$ , hiperfosforilaciju tau proteina, kao i regulaciju apoptoze. Takođe je pokazana veza i između smanjenog nivoa holesterola u mozgu i poremećaj u organizaciji lipidnih pontona koja je asocirana sa patogenezom AB (Zu i sar., 2022). Nizak nivo holesterola u mozgu se povezuju i sa drugim patologijama CNS-a, kao što su Smit-Lemli-Opitzov sindrom, kao i Neiman-Pikova bolest tip C (Martin i sar., 2014). Smanjeni nivo holesterola u mozgu kod AB je povezan sa smanjenim uklanjanjem A $\beta$  kao i akumulacijom tau proteina. Različite forme *ApoE* gena su uključene u ovaj proces (Liu i sar., 2013). Obrada amiloid prekursor proteina (APP) je pod jakim uticajem lipidnog okruženja, ukazujući na dvosmernu vezu između obrade APP-a i metabolizma holesterola u mozgu (Grimm i sar. 2017; Mett i sar., 2016).

Pokazano je da APP može da inhibira sintezu holesterola i u neuronima i u glijskim ćelijama (Zhang i sar., 2023). Tako je i u mozgu 5XFAD miševa pokazano da povećana ekspresija A $\beta$  inhibira ekspresiju gena uključenih u sintezu holesterola, što dovodi do smanjenja nivoa holesterola u mozgu. Rezultati istraživanja su pokazali da postoji značajna inhibicija biosinteze holesterola praćena sniženim nivoima holesterola u hipokampusu kod 5XFAD životinja u poređenu sa WT kontrolama (Zhang i sar., 2023). Mišiji transgeni modeli sa prekomernom ekspresijom APP u mozgu su pokazali značajno niže nivoe holesterola od APP *knock-out* miševa, što potvrđuje da prekomerna ekspresija APP smanjuje količinu holesterola u mozgu (Huang i sar., 2023).

## 1.5. Lipidi i krvni sudovi mrežnjače

Neizbalansiran nivo lipida u mrežnjači dovodi do disfunkcije endotelnih ćelija, što je važan faktor za nastanak bolesti mrežnjače. Istraživanja pokazuju da preko 20% okluzija krvnih sudova mrežnjače nastaju zbog poremećene homeostaze lipida u krvnim sudovima mrežnjače (Prakash i sar., 2017). Mrežnjača je posebno podložna promeni lipidnog sastava membrane zbog konstantnog izlaganja svetlu (Hao i sar., 2002). Nekontrolisana proizvodnja lipida u mrežnjači dovodi do poremećaja integriteta mikrovaskulature mrežnjače, što dalje ima za posledicu poremećaj funkcionisanja KMrB i njene povećane propustljivosti (Antonetti i sar., 2021).

Jedna od glavnih karakteristika endotelnih ćelija CNS-a, koje izgrađuju krvno-moždane (KMB) i KMrB barijeru, jeste nizak nivo transporta vezikula (transcitoze). Sastav lipida u endotelnim ćelijama CNS-a je važan faktor u regulaciji transcitoze i propustljivosti KMB i KMrB. Predloženi mehanizam delovanja membranskih lipida uključuje inhibiciju

kaveolinom-posredovanog signalnog puta. Membrane endotelnih ćelija čine kaveole i lipidne pontone (Busik i sar., 2008). Kaveole su uvrati ćelijske membrane veličine 50 nm -100 nm (Bastiani i Parton, 2010). Najzastupljeniji lipid u lipidnim pontonima je holesterol. DHK, omega-3 PNMK, je takođe jedan od glavnih strukturnih lipida kako nervnog, tako i vaskularnog dela mrežnjače, pa je pravilna homeostaza DHK ključna i za normalno funkcionisanje krvnih sudova (Mason i sar., 2020) Lipidni sadržaj, kao i odnos holesterola i DHK u membranama endotelnih ćelija igra važnu ulogu u regulaciji transcitoze. Inkorporacija DHK u kaveole u membranama i posledično izmeštanje holesterola iz lipidnih pontona, bi mogla da ima protektivni efekat na patološke procese u endotelnim ćelijama. Preostali holesterol učestvuje u stabilizaciji sadržaja masnih kiselina u lipidnim pontonima (Busik i sar., 2007). Iz svega navedenog možemo da zaključimo da su DHK i holesterol ključni za očuvanje integriteta KMB i KMrB.

### **1.5.1. Promene u krvnim sudovima u oku i CNS-u u Alchajmerovoj bolesti**

Skorašnja istraživanja pokazuju da cerebralna vaskularna disfunkcija predstavlja glavni faktor koji doprinosi nastanku AB i cerebralne amiloidne angiopatije (CAA) i na taj način može da bude rani pokazatelj kognitivnog poremećaja (Xiong i sar., 2018) CAA se manifestuje mikrokrvarenjima, infarkt, promenama u beloj masi i kognitivnim problemima (Saito i sar., 2016). Cerebralna vaskularna oštećenja, kao što je ishemija, vode do poremećenog dotoka nutrijenata, povećanog oksidativnog stresa i inflamatornog odgovora, poremećenog uklanjanja A $\beta$  i poremećene funkcije enzima koji obrađuje amiloid (Marchesi, 2011), što sve vodi neurodegeneraciji i kognitivnom propadanju. Postoje studije koje ukazuju na to da bi smanjen cerebralni protok krvi, koji je povezan sa neadekvatnim uklanjanjem A $\beta$ , mogao da predvidi početak kliničke demencije (Wolters i sar. 2017; Govindpani i sar., 2019). Takođe, ispitivanja mozga pacijenata koji boluju od AB pokazuju poremećenu propustljivost KMB, što takođe dovodi do nagomilavanja A $\beta$  u krvnim sudovima. Kako je mrežnjača povezana sa mozgom preko optičkog nerva, kao i krvnim sudovima, omogućen je transport A $\beta$  i tau kroz CNS i na taj način se pospešuje napredak patologije AB u mrežnjači (Morin i sar., 1993). Pokazana je veza između neadekvatnog funkcionisanja glimfatičkog sistema u životinjskim modelima AB (Harrison i sar., 2020; Jessen i sar., 2015) i neadekvatnog uklanjanja A $\beta$  u AB (Louveau i sar., 2015; Da Mesquita i sar., 2018; Ahn i sar., 2019). Skoro je kod glodara otkriven i glimfatički sistem oka čije se funkcionisanje zasniva na akvaporin-4-zavisnom putu uklanjanja tečnosti i metabolita (Wang i sar., 2020).

Razumevanje mehanizama koji su u osnovi vaskularne patofiziologije AB i nalaženje novih terapeutika koji bi se na njima zasnivali je jedan od svetskih naučnih prioriteta (Montine i sar., 2012). Klinička istraživanja i studije na animalnim modelima pokazuju da mrežnjača može da posluži kao prozor za ranu dijagnostiku AB. Ispitivanjem vida pacijenata koji boluju od AB su primećene razne patološke promene kao što su smanjenje oštrine vida, smanjenje osetljivosti na kontrast, nemogućnost razlikovanja boja, poremećen odgovor na pERG, kao i defekti u vidnom polju. Analize optičke koherentne tomografije su pokazale i morfološke promene koje ukazuju na deficit u vaskulaturi mrežnjače (Chiquita i sar. 2019).

Kod mišijeg 5XFAD modela je pokazano da neurodegeneracija mrežnjače asocirana sa amiloidnom patologijom prati promene napredovanja bolesti slične onima u mozgu (Nguyen i sar., 2014). Kod 5XFAD modela je uočeno i prisustvo A $\beta$  i tau klubadi u mrežnjači, kao i reaktivna glija (Chiquita i sar., 2019). Specifična karakteristika 5XFAD

mrežnjače je odsustvo amiloidnih plaka zbog toga što se *Thy1* promotor, koji je odgovoran za prekomernu ekspresiju A $\beta$  u ovom modelu, ne eksprimira u oku (Oblak i sar., 2021) tako da su krvni sudovi glavno mesto nakupljanja A $\beta$ . Predloženo je da bi uočene promene u mrežnjači 5XFAD miševa mogle da predvide propadanje kognitivnih funkcija u mozgu (Shi i sar., 2021).

## 1.6. Lipidi u pigmentnom epitelu mrežnjače

MPE obavlja mnoge važne funkcije koje omogućavaju pravilno funkcionisanje mrežnjače, kao što su apsorpcija svetlosti, transepiteni transport, puferisanje jona u međućelijskom prostoru, fagocitoza spoljašnjih segmenata fotoreceptora i vizuelni ciklus. Čelije MPE-a su stalno izložene oksidativnom stresu zbog metabolisanje spoljašnjih segmenata fotoreceptora. Kako se SS sastoje prvenstveno od lipida, od čega su najviše prisutni DHK i holesterol, njihov izbalansiran odnos u mrežnjači je ključan za pravilno funkcionisanje MPE-a. Pokazano je da koncentracija DHK u ćeliji koja je veća ili manja od optimalne može da poveća sklonost MPE-a ka oksidativnom stresu, što može dovesti do umiranja ćelija MPE-a (Neiteler i sar., 2023). Pored ovoga, skoro sve patologije oka ukazuju na kompromitovanu homeostazu holesterola u MPE-u (SMD, glaukom, AB), ukazujući da je pravilna homeostaza holesterola u MPE-u neophodna za očuvanje funkcionalnosti mrežnjače. Međutim, i dalje je nedovoljno istraženo na koji način su regulisani nivoi holesterola u MPE-u i na koji način su oni poremećeni u patološkom stanjima.

### 1.6.1. Vizuelni ciklus retinala u pigmentnom epitelu mrežnjače

Jedna od glavnih funkcija MPE-a je enzimska regeneracija hromofora fotoreceptora (11-cis retinal) kroz vizuelni ciklus (VC), cikličnog puta koji se sastoji iz serije enzimskih reakcija gde se u svakom koraku konvertuju intermedijeri retinoida.

Glavne komponente VC su enzimi (retinalni epitel-vezujući protein 65, *rpe65* i 11-cis retinol dehidrogenaza 5, *Rdh5*), dva nosača retinoidnih proteina (retinaldehid-vezujući protein 1, *Rlbp1* i retinol-vezujući protein 1, *Rbp1*), kao i njihov modulator (receptori spregnuti sa G-proteinom, *Rgr*). Ove komponente rade sekvencijalno u cilju regenerisanja i konstantnog snabdevanja fotoreceptora 11-cis retinalom.

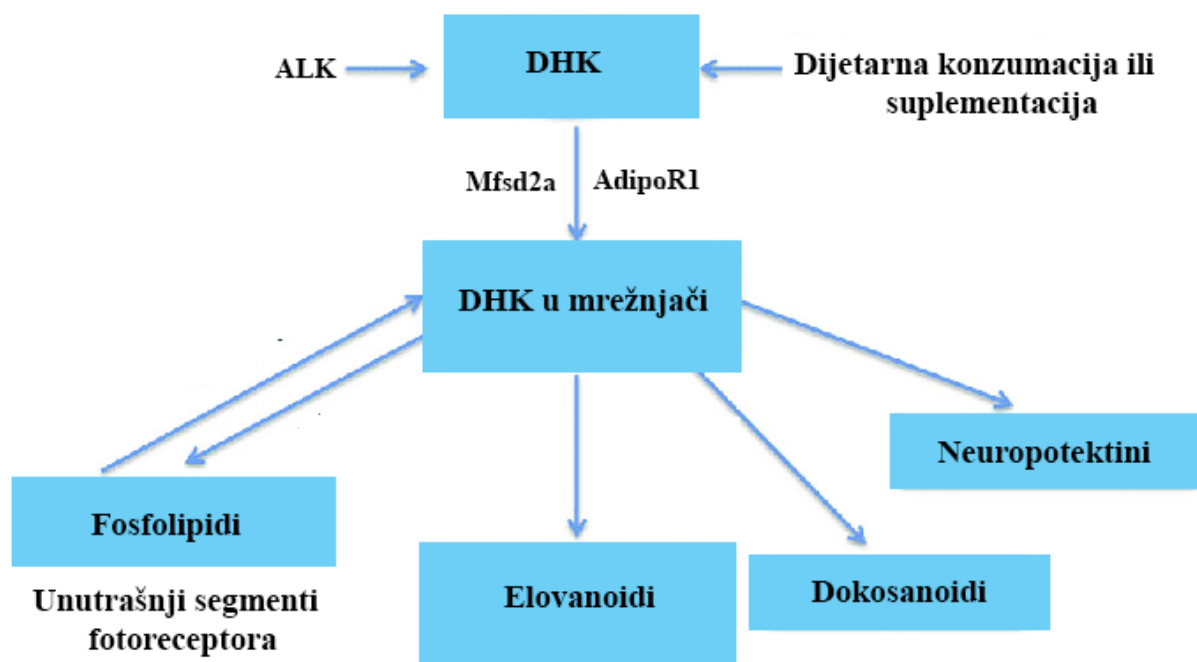
Ključni transkripcioni faktori za koje je pokazano da su neophodni za razviće MPE-a kao i za pravilno funkcionisanje VC su *Otx2* (ortodontikularni homeoboks 2 protein), *Sox9* (SRY-vezan HMG boks transkripcioni faktor 9) i *Lhx2* (lim-homeoboks protein 2) (Martinez-Morales, 2016). *Sox9* transkripcioni faktor je predložen kao ključni molekul u regulaciji VC-a koja se postiže aktivacijom *Best1* promotora u MPE-u putem prethodne aktivacije *Otx2* transkripcionog faktora (Masuda i sar., 2014). Pored *Otx2* i *Sox9*, važan transkripcioni faktor koji igra ulogu u ranom razvoju oka je *Lhx2* (Hobert i Westphal, 2000). *Sox9* je identifikovan kao direktan cilj molekul *Lhx2* što ukazuje na njihovu moguću direktnu ulogu u regulaciji VC-a (Mardaryev i sar., 2010). U proces VC su uključeni i geni povezani sa funkcijom vizuelnog pigmenta rodopsina, kao što su tirozinaza 1 (*Tyr1*), tirozinaza-vezujući protein 1 (*Tyrp1*) i dopahrom tautomeraza (*Dct*). Pokazano je da bi holesterol mogao da reguliše jedan od najvažnijih gena vizuelnog ciklusa, *Rpe65*. Kada je poremećena homeostaza holesterola u mrežnjači i njegov sadržaj povišen, dolazi do povećane proizvodnje 11-cis retinala usled povećane ekspresije *Rpe65* (Masuda i sar., 2014).



## 1.7. Suplementacija nezasićenim masnim kiselinama

U poslednjih 150 godina, usled modernog načina života, došlo je do drastične promene u odnosu omega-6 i omega-3 masnih kiselina u ishrani od 1:1 u 20:1 (Milanovic i sar., 2018). Nedostatak omega-3, pre svega DHK, je povezan sa razvojem različitih patologija oka, uključujući bolest suvog oka, glaukom, SMD, dijabetičnu retinopatiju, kao i promene u oku vezane za AB (Cornwell, 2022; Sugasini i sar., 2023, Ajith, 2018). Poremećaji u nivou DHK dovode i do poremećenog elektroretinografskog odgovora, povećanog nagomilavanja derivata toksičnog vitamina A, kao i degeneracije fotoreceptorskih ćelija u centralnoj mrežnjači (Karan i sar., 2005). Posebno je zanimljivo da je nivo DHK u mrežnjači smanjen kod pacijenata koji boluju od AB, dok dijeta bogata DHK smanjuje nivo amiloida u mrežnjači, što ukazuje na mogućnost da DHK suplementacija može poboljšati promene u mrežnjači povezane sa AB (Sugasini i sar., 2023).

Međutim, kapacitet mrežnjače da sintetiše DHK je ograničen, i održavanje nivoa DHK u mrežnjači zavisi od preuzimanja iz spoljašnjih izvora, kao što su lipidi iz krvi (Scott i Bazan, 1989). Unos PNMK putem hrane ili suplementacijom ribljim uljem, ostaje primaran izvor ovih lipida (Hopperton i sar., 2018). Važno je naglasiti da se suplementacija ribljim uljem (RU) smatra potencijalnim terapeutikom kod abnormalne vaskularizacije mrežnjače (Connor i sar., 2007; Sapielha i sar., 2012). Na Slici 5 možemo videti šemu preuzimanja DHK.



**Slika 5.** Šematski prikaz preuzimanja DHK u mrežnjači. Izvori DHK uključuju konverziju alfa-linolne kiseline (ALK) u DHK u jetri, dijetarnu konzumaciju i suplementaciju. ALK je omega-3 masna kiselina koja je najčešće konvertovana u EPK, zatim u DHK u jetri. Preuzimanje DHK u mrežnjači se odvija u pigmentnim epitelijalnim ćelijama, kao i u ćelijama i štapićima. (Modifikovano iz Zhuo i sar., 2020)

Pokazano je da suplementacija RU-em ne daje homogene rezultate u većini studija jer ne reaguju svi ispitanici na isti način na tretman (Zhang i sar., 2021; Beken i sar., 2013; Najm i sar., 2017). Skorašnja otkrića pokazuju da suplementacija niskim dozama ima za rezultat nisku dostupnost DHK u mozgu, te su pozitivni efekti RU značajno smanjeni (Arellanes i sar., 2020). Zato se u poslednje vreme preporučuje suplementacija visokim dozama omega-3 PNMK u kliničkim studijama kod pacijenata koji boluju od AB (Arellanes i sar., 2020). Visoke doze n-3 masnih kiselina su preporučene i kao tretman u kliničkim studijama kod pacijenata koji pate od blage povrede mozga (Patch i sar., 2021), u ranom periodu terapije kod velikog depresivnog poremećaja (Luo i sar., 2020), kao i kod mišijih modela AB (Milanovic i sar., 2018; Jović i sar., 2019). Pokazano je da su visoki nivoi omega 3 u krvi asocirani sa smanjenim rizikom od AB i drugih oblika demencije (Ajith, 2018). Istraživanja su pokazala da nivo DHK u mrežnjači može takođe da se efikasno poveća putem suplementacije ribljim uljem (RU) (Querques i sar., 2011). Preporučeni profilaktički dnevni unos PNMK kod ljudi koji nemaju demenciju je 360-540 mg eikozapentanoične kiseline EPK i 240-360 mg DHK. Evropski Panel o Dijetetskim Proizvodima, Nutriciji i Alergijama (2012) je doneo zaključke da kombinovana suplementacija visokim dozama EPK i DHK (do 5 g dnevno u trajanju do 16 nedelja) ne povećava rizik od epizoda spontanog krvarenja, kao i da ne utiče na homeostazu glukoze, imunsku funkciju, lipidnu peroksidaciju i da se smatra bezbednom za upotrebu.

Istraživanja pokazuju da je nivo DHK smanjen kod 5XFAD mišjeg modela AB već od uzrasta od jednog meseca i da suplementacija RU-em povećava nivo ukupnog A $\beta$  u mrežnjači (Sugasini i sar., 2023). Ovi rezultati potvrđuju da bi suplementacija RU mogla imati pozitivan efekat na promene u mrežnjači asocirane sa AB, i kod drugih bolesti mrežnjače (Sugasini i sar., 2023).

### **1.7.1. DHK receptori/transporteri u mrežnjači**

Mrežnjača preuzima DHK pomoću više tipova receptora – lipoproteinskih (SanGiovanni i Chew, 2005), adiponektinskih (Bazan, 2015), transportera masnih kiselina (Tachikawa i sar., 2018), kao i D2A transporter MFS nadporodice (MFSD2A) (Nguyen i sar., 2014; Ben-Zvi i sar., 2014; Wong i sar., 2016).

Adiponektinski receptor 1 (ADIPOR1) je receptor za hormon adiponektin koji ima ključnu ulogu u bolestima povezanim sa gojaznošću, kao što je insulinska rezistencija tipa 2, dijabetes i arterioskleroza (Okada-Iwabu i sar., 2013). Takođe, pokazano je da je on integralni membranski protein koji je neophodan za preživljavanje fotoreceptora. ADIPOR1 učestvuje u zadržavanju DHK u fotoreceptorima i MPE-u, a ablacija ovog receptora u mrežnjači dovodi do degeneracije fotoreceptora. (Bazan, 2015).

MFSD2A je glavni nosač za preuzimanje DHK i nalazi se na endotelnim ćelijama koje ulaze u sastav KMB i KMrB. Gubitak funkcije MFSD2A kod ljudi dovodi do autozomno recesivne primarne mikrocefalije (Razmara i sar., 2020), a studije na nokaut miševima su potvrdile ovaj fenotip (Li i sar., 2021) i pokazale da je Mfsd2a posredovan DHK transport kritičan za pravilno funkcionisanje ćelijskih membrana u nervnom tkivu i za održavanje sastava fosfolipida (Cater i sar., 2021; Wong i sar., 2016).

### 1.7.2. Efekat ribljeg ulja na transcitozu

MFSD2A je prepoznat kao jedan od glavnih regulatora propustljivosti KMrB i nalazi se na endotelnim ćelijama krvnih sudova mrežnjače, i predstavlja glavni receptor DHK u mrežnjači. Endotelne ćelije mrežnjače imaju nisku stopu transcitoze što omogućava ograničen transćelijski transport kroz KMrB (Wu i sar., 2023). Pokazano je da je povećana transcitoza vezikula u endotelijalnim ćelijama kod *Mfsd2a*<sup>-/-</sup> miševa odgovorna za povećanu propustljivost KMrB a da njegova povećana ekspresija u oku smanjuje neovaskularizaciju mrežnjače i vaskularnu propustljivost u mišjim modelima retinopatije (Zhang i sar., 2021). Pored ovoga, manipulacija wingless-related integration site (Wnt) puteva reguliše integritet KMB kroz regulaciju MFSD2A-posredovane kaveolarne transcitoze (Wang i sar., 2020). MFSD2A ulazi u fokus brojnih istraživanja zbog toga što je pokazano da njegova indukovana ekspresija može očuvati integritet KMB i KMrB. Sa starenjem je primećeno značajno smanjenje ekspresije MFSD2A u mozgu (Iwao i sar., 2023). Skorašnja otkrića ukazuju da virusom indukovana prekomerna ekspresija MFSD2A može da ublaži poremećaje u učenju i pamćenju nastalih kao posledica krvarenja u mozgu (Yang i sar., 2017), kao i da suplementacija DHK ima mnogo jači neuroprotektivni efekat ako je povećana ekspresija MFSD2A u mrežnjači (Zhang i sar., 2021). Uzimajući u obzir činjenicu da je kod značajnog dela pacijenata slab efekat terapije sa n-3 LC-PUFA kod neovaskularizacije mrežnjače (Zhang i sar., 2021), manipulacija sa nivoima ekspresije MFSD2A predstavlja zanimljiv cilj istraživanja.

To znači da bi MFSD2A mogao da bude potencijalni univerzalni ciljni molekul za terapije različitih starosno-zavisnih patologija koje bi se zasnivale na regulaciji poremećene propustljivosti KMB i KMrB.

### 1.7.3. Efekat suplementacije ribljim uljem na glimfatički sistem

Skorašnja istraživanja su otkrila mrežu paravaskularnih puteva u mozgu, koji imaju ključnu ulogu u eliminaciji ekstraćelijskih molekula iz CNS-a, uključujući i A $\beta$  (Wang i sar.; 2020; Illif i sar., 2014; Plog i sar., 2015). Ova mreža paravaskularnih puteva se naziva glimfatički sistem. Glavni regulator funkcije glimfatičkog sistema je akvaporin 4 (AQP4), proteinski membranski kanal, koji doprinosi uklanjanju A $\beta$  iz mozga putem astroglialne mreže. Pokazano je da starenje može da poremeti funkciju glimfatičkog sistema tako što dovodi do skoro 40 % manje efikasnosti u uklanjaju A $\beta$  kod starijih miševa u odnosu na mlade (Xie i sar., 2013). Takođe, sa starenjem dolazi do povećane ekspresije AQP4 (Zeppenfeld i sar., 2017), i promene u ekspresiji AQP4 korelišu sa stepenom ozbiljnosti simptoma CAA (Hoshi i sar., 2012; Moftakhar i sar., 2010). U zdravom mozgu postoji jasno izražena polarizacija AQP4 na stopalcima astrocita, a poremećaj ove polarizacije dovodi do poremećaja funkcije glimfatičkog sistema. Aktivacija astrocita značajno smanjuje polarizaciju AQP4, smanjujući perivaskularnu ekspresiju AQP4 i povećavajući njegovu ekspresiju na ćelijskim telima glijskih ćelija (Ren i sar., 2013).

Ispitana je i uloga tretmana RU-em na eliminaciju A $\beta$  iz krvnih sudova u mozgu, gde je prvi put pokazano da funkcija glimfatičkog sistema može biti regulisana tretmanom RU-em koje dovodi do aktivacije glimfatičkog sistema i efikasnijeg uklanjanja A $\beta$  iz mozga (Ren i sar., 2017). AQP4-zavisan glimfatički sistem aktivno učestvuje u pojačavanju efekta PNMK na uklanjanje ekstraćelijskog A $\beta$  (Ren i sar., 2017; Zhang i sar., 2020). Pokazano je da nema

poboljšanja u eliminaciji A $\beta$  kod AQP4 knockout miševa, što potvrđuje ključnu ulogu AQP4 kanala u delovanju RU-a na glimfatički sistem (Liang i sar., 2015).

### **1.8. Efekat suplementacije ribljim uljem na homeostazu holesterola**

Homeostaza holesterola i PNMK imaju važnu ulogu u razvoju i funkciji mrežnjače i mozga. Veliki unos hrane bogate holesterolom je praćen većim rizikom od srčanih bolesti i ima ulogu u nastanku AB, dok veći unos PNMK deluje suprotno. Ovakve promene nisu primećene u mozgu, što znači da različiti mehanizmi regulacije metabolizma lipida deluju u mozgu i u oku. Najvažnije zabeležena promena u oku je da visok nivo holesterola smanjuje nivo DHK u mrežnjači (Jia i sar., 2021). Potrebna su dalja ispitivanja kompleksnih uloga holesterola i PNMK u normalnim i patološkim stanjima oka i mozga.

Fluidnost membrane je ključna za pravilno funkcionisanje CNS-a, a ona je zavisna od lipidnog sadržaja membrana. Fluidnost membrane je određena odnosom fosfolipida i slobodnog holesterola u njoj jer PNMK povećavaju fluidnost membrane dok holesterol povećava njenu viskoznost. Dijeta bogata visokim nivoima PNMK omogućava inkorporaciju holesterola u membrane da bi se održao balans u nivou njihove fluidnosti, što posledično smanjuje nivo holesterola u krvi. Mehanizam delovanja PNMK na homeostazu holesterola bi mogao da deluje pomoću regulacije ekspresije sterol-regulatornog p-vezujućeg proteina (*Srebp*) ili *Lxr* gena, ali su potrebna dalja istraživanja koja bi razjasnila mehanizme delovanja PNMK na CNS (Kitajka i sar., 2004).

## 2. CILJEVI

Holesterolska homeostaza u oku je podložna starosno-zavisnim promenama koje mogu da ugroze pravilnu funkciju specifičnih očnih struktura, mrežnjače i pigmentnog epitela mrežnjače (MPE), kao i da stimulišu formiranje i taloženje toksičnog amiloida beta ( $A\beta$ ). Neposredni cilj ove doktorske disertacije je da se ispituju promene ekspresije gena koji regulišu metabolizam holesterola u fiziološkom i patološkom starenju, kao i da se ispita efekat suplementacije ribljim uljem, prirodnog izvora omega-3 masnih kiselina, za koje je pokazano da imaju važnu ulogu u regulaciji holesterolske homeostaze. U skladu sa navedenim, postavljeni su i pojedinačni zadaci istraživanja:

1. Ispitivanje promena ekspresije gena koji regulišu holesterolsku homeostazu u fiziološkom starenju u mrežnjači i MPE-u.
2. Ispitivanje promena ekspresije gena koji regulišu holesterolsku homeostazu u patološkom starenju (mišji model Alchajmerove bolesti, AB) u mrežnjači i MPE-u.
3. Ispitivanje efekta suplementacije ribljim uljem (RU-em) na ekspresiju gena regulatora holesterolskog metabolizma, u presimptomatskoj fazi AB, kao i na formiranje i taloženje  $A\beta$  u mrežnjači.
4. Ispitivanje promena ekspresije glavnih regulatora transcitoze (MFSD2A) i glimfatičkog sistema (AQP4) u mrežnjači tokom fiziološkog starenja.
5. Ispitivanje promena ekspresije glavnih regulatora transcitoze (MFSD2A) i glimfatičkog sistema (AQP4) u mrežnjači tokom patološkog starenja (mišji model AB).
6. Ispitivanje efekta suplementacije RU-em na ekspresiju glavnih regulatora transcitoze i glimfatičkog sistema, kao i na formiranje i taloženje  $A\beta$  u presimptomatskoj fazi AB u mrežnjači.

### 3. MATERIJAL I METODE

#### 3.1. Etička izjava

Sve eksperimentalne procedure su sprovedene u saglasnosti sa Direktivom 2010/63/EU o zaštiti životinja koje se koriste u eksperimentalne i naučne svrhe i odobrene su od strane Etičkog komiteta Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković”, Instituta od nacionalnog značaja Republike Srbije, Univerziteta u Beogradu (Rešenje br. 03-05/14). Korišćen je minimalan broj jedinki neophodan za realizaciju eksperimenata, uz maksimalnu brigu o životinjama.

#### 3.2. Eksperimentalne životinje

Za potrebe ovog istraživanja, transgeni 5XFAD miševi i njihov izvorni soj B6SJLF1/J su nabavljeni od kompanije „Jackson Laboratories” (Bar Harbor, Mejn, SAD; kat. br.: 3484-JAX i 100012-JAX). Životinje upotrebljene u eksperimentu, ženke F1-generacije, su dobijene ukrštanjem 5XFAD transgenih mužjaka sa B6SJLF1/J ženkama, a kao kontrolne životinje su korišćene ne-transgene ženke iz istih okota (wild-type - WT). 5XFAD miš prekomerno eksprimira mutirani ljudski amiloidni prekursorski protein 695 sa švedskom mutacijom (K670N, M671L: povećava proizvodnju totalnog A $\beta$ ), Florida mutacijom (I716V: specifično povećava proizvodnju A $\beta$ 42 fragmenta), London mutacijom (V717I: specifično povećava proizvodnju A $\beta$ 42 fragmenta), i mutacijama u ljudskom presenilinu 1 sa dve FAD mutacije (M146L and L286V: specifično povećavaju proizvodnju A $\beta$ 42 fragmenta).

Životinje su odgajane u vivarijumu Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković”, u providnim kavezima od pleksiglasa sa prostirkom od sterilisane šuške (n=5 životinja po kavezu), u specijalnom sistemu za gajenje životinja sa ventilacijom, pod standardnim uslovima (temperatura: 23 $\pm$ 2 °C, relativna vlažnost vazduha: 60–70%, 12-časovni ciklus svetlost/mrak, slobodan pristup vodi). Za ishranu životinja je korišćena standardna briketna hrana (Tabela 1.).

**Tabela 1.** Peletizovani komercijalni sastav hrane. ZMK - zasićene masne kiseline; PNMK - polinezasićene masne kiseline; n-3 - omega-3; n-6 - omega-6.

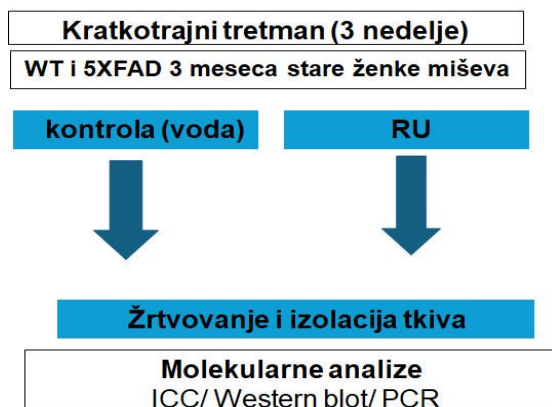
Sadržaj	Procenat
Proteini	17,2%
Ugljenihidrati	60,9%
Masti	3,7%
PNMK/ZMK	1,3%
n-3/n-6 PNMK	0,05%
vlakna	5,6%
pepeo	7,6%
Vitamini i minerali	

### 3.3. Određivanje genotipa

Određivanje genotipa životinja iz svakog okota je rađeno putem izolacije DNK iz tkiva repa, nakon čega je analizirana pomoću lančane reakcije polimeraze (PCR, od eng. *Polymerase Chain Reaction*). Korišćeni su adekvatni setovi prajmera u skladu sa preporukama proizvođača. Tkivo repa je prvo stavljano u ependosrfice za PCR reakcije koje su imale u sebi 75 µl rastvora A (alkalni pufer za liziranje tkiva: 25 mM NaOH; 0,2 mM EDTA). U sledećem koraku uzorci su inkubirani na 95 °C u trajanju od 45 min, nakon čega su vorteksovani i u ependorfice je dodato po 75 µl rastvora B (pufer za neutralizaciju, 40 mM Tris-HCl). U reakcione smeše je, pored prajmera, dodato 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM dNTP i 1 U Taq polimeraze (Fermentas, Kina). Stavljano je po 1 µl uzorka u svaku ependorficu. Reakcije su sprovedene u *ProFlex® PCR System* uređaju (Applied Biosystems, SAD) prema odgovarajućem protokolu: inicijalna denaturacija je trajala 2 min na 95 °C, nakon čega je sledilo 30 ciklusa koji su podrazumevali: denaturaciju u trajanju od 15 sekundi na 95 °C, aniling u trajanju od 30 sekundi na 62 °C i elongaciju u trajanju od 30 sekundi na 72 °C, sa finalnom elongacijom od 2 minuta na 72 °C.

### 3.4. Eksperimentalne grupe i dizajn eksperimenta

U istraživanju je upotrebljeno ukupno 76 miševa: ukupan broj 5XFAD transgenih miševa ženskog pola je iznosio 38 (5XFAD), dok je 38 ženki predstavljalo njihove ne-transgene kontrole (WT). Za potrebe ispitivanja fiziološkog i patološkog starenja miševi su nasumično raspoređeni u četiri grupe: **4 M WT** grupa (n=12) – ne-transgeni miševi starosti četiri meseca, **4 M 5XFAD** grupa (n=12) – transgeni miševi starosti četiri meseca, **12 M WT** grupa (n=12) – ne-transgeni miševi starosti 12 meseci i **12 M 5XFAD** grupa (n=12) – transgeni miševi starosti 12 meseci. Za potrebe ispitivanja efekta tretmana ribljim uljem životinje su takođe nasumično raspodeljene u četiri grupe: **WT RU** grupa (n=7) – ne-transgeni miševi tretirani ribljim uljem, **5XFAD RU** grupa (n=7) – transgeni miševi tretirani ribljim uljem, **WT** grupa (n=7) – ne-transgeni miševi tretirani vodom, **5XFAD** grupa (n=7) – transgeni miševi tretirani vodom. Tretirane životinje su suplementirane komercijalnim ribljim uljem (DietPharm, FidaFarm Hrvatska), kao bogatim izvorom omega-3 masnih kiselina (Tabela 2), dok su netretirane životinje na isti način (ista zapremina, način davanja i trajanje) primale vodu. Životinje su oralnom gavažom dobijale po 100 µl ribljeg ulja ili vode jednom dnevno tokom 21 uzastopnog dana (Slika 6), a tretiranje životinja je započeto kada su životinje imale tri meseca.



Slika 6. Šematski prikaz kratkotrajnog tretmana ribljim uljem (RU) u presimptomatskoj fazi AB.

Doza davana u našem istraživanju je određena kao visoka doza dokozaheksaoinske i eikozapentanoinske kiseline (DHK i EPK). Ekvivalentna dnevna doza DHK za ljude bi bila oko 3000 mg na 50 mg/kg telesne mase (t.m.). Ekvivalentna doza je računata prateći FDA (SAD vodič za hranu i lekove) vodiče za konverziju doza između vrsta. Ukratko, (mg/kg) je računata kao ljudska doza pomnožena sa faktorom korekcije za miša (Km) AED (mg/kg) = 50 mg/kg × 12,3 = 615 mg/kg. Za ljudsku dozu od 50 mg/kg AED doza za miša je 615 mg/kg. Ovo znači da doza kojom su tretirane životinje, 545,5 mg/kg DHK i 818,2 mg/kg EPK dnevno, odgovara 12 mg DHK i 18 mg EPK dnevno kod ljudi. Komercijalno riblje ulje sadrži i druge masne kiseline (kao dodatak omega-3 i omega-6 masnim kiselinama), kao i jodin, furansku kiselinu, i vitamin E koji je antioksidant i potencijalno može i sam da ima različite efekte (Hopperton i sar., 2018), zbog čega nisu korišćena druga ulja kao kontrola. Sa druge strane, kontrolna ulja mogu da sadrže neke postojeće aktivne sastojke ili dodate komponente koje mogu da interferiraju sa direktnim efektima ribljeg ulja što može da dovede do pogrešne interpretacije rezultata i pogrešnih zaključaka. Zbog svega navedenog, nismo želeli da poredimo efekte dva ulja (ulja od interesa i kontrolnog ulja) i zato je kao kontrola korišćena voda.

**Tabela 2.** Sastav masnih kiselina u RU (% w/w od ukupnih MK). ZMK - zasićene masne kiseline; MNMK - mono-nezasićene masne kiseline; n-6 - omega-6 poli-nezasićene masne kiseline (PNMK); n-3 - omega-3 PNMK; EPK - eikozapentanoinska kiselina; DPK - dokozaheksanoinska kiselina; DHK - dokozaheksanoinska kiselina.

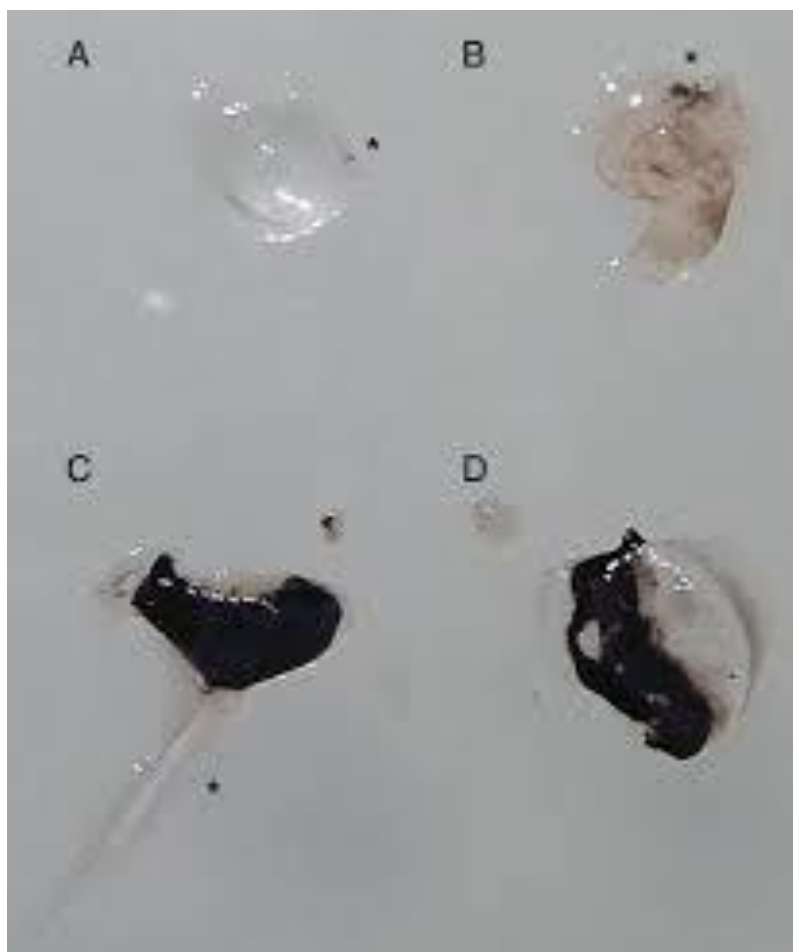
MK	Broj ugljenika	Korišćeni naziv	Procenat
ZMK	16:0n	palmitinska	22,90
	18:0n	stearinska	2,23
MNMK	16:1n-7	palmitoleinska	11,90
	18:1n-9	oleinska	10,25
	18:1n-7	vakcenska	4,54
	18:2n-6	linoleinska	1,67
	20:3n-6	dihomo-gama-linoleinska	0,29
	20:4n-6	arahidonska	1,62
	22:4n-6	adrenična	1,78
	20:5n-3	EPK	25,51
	22:5n-3	DPK	1,82
	22:6n-3	DHK	15,49

### 3.5. Sakupljanje uzoraka

Životinje su u trenutku žrtvovanja bile stare četiri, odnosno dvanaest meseci. Miševi su intraperitonealno anestetizirani kombinacijom ketamidora (100 mg/kg t.m., Richter Pharma, Wells, Austrija) i ksilazida (16 mg/kg t.m., Xylased, Bioveta, Republika Češka). Potom je svaka životinja perfundovana sa 50 ml 0,1 M fosfatom fosforilisan fiziološki rastvor (eng. *Phosphate-buffered saline*, PBS) 30 min i dekapitovana. Izolovane su oči iz očne duplje, odsečen je optički nerv, a rožnjača, sočivo i staklasto telo su uklonjeni. Mrežnjača je očišćena od vezivnog tkiva i sklonjena za dalju analizu. Svi uzorci tkiva su čuvani na -80 °C u cilju dalje izolacije RNK, proteina i masnih kiselina. Izolovani su mrežnjača i MPE iz 7 očiju po grupi i obrađeni su za izolaciju RNK i dalje qPCR. Za Western blot analizu uzoraka nakon tretmana RU-em je korišćeno 4-6 uzoraka mrežnjače i MPE-a. Za istraživanje promena u



mrežnjači tokom fiziološkog i patološkog starenja korišćeno je 6 životinja po grupi gde su takođe izolovani mrežnjača i MPE iz po jednog oka, dok je drugo oko iz kontrolnih i 5XFAD životinja (n=4) izolovano i obrađeno dalje za imunohistohemiju.



**Slika 7.** Izolacija mrežnjače miša. Staklasto telo (A), mrežnjača (B), optički nerv (C), MPE (D)

### **3.6. Kvantitativna polimerazna lančana reakcija u realnom vremenu (qRT-PCR)**

#### **3.6.1. Izolacija RNK i reverzna transkripcija**

Ukupna RNK je ekstrahovana iz očiju izolovanih iz kontrolnih i tretiranih životinja (n=5–7 po grupi), prateći uputstva proizvođača za sistem izolacije putem TRIZOL-a (Invitrogen Life Technologies, SAD), gde je za svaki uzorak dodavano 500  $\mu$ l trizola i rađena homogenizacija ručno, nakon čega je dodato još 500  $\mu$ l trizola i uzorci su stajali 15 min. Nakon toga je dodato 200  $\mu$ l hloroforma i mućkano 15 sekundi. Nakon centrifugiranja 15 min. na 11900 g odvojena je vodena faza. RNK talog je rastvoren u 20  $\mu$ l DEPC vode, koncentracija RNK je određena spektrofotometrijskom metodom, i intaktnost RNK je potvrđena 1% agaroznom gel elektroforezom. Šest  $\mu$ g ukupne RNK je tretirano sa DNazom I koja je prečišćena od RNaza (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD). Urađena je reverzna transkripcija u istoj tubi pomoću High-Capacity cDNA Archive Kit (Applied

Biosystems, SAD), prateći uputstva proizvođača. cDNK je skladištena na -20 °C do dalje upotrebe.

### 3.6.2. Kvantitativni PCR u realnom vremenu (qRT-PCR)

20 ng izolovane cDNK je upotrebjeno za PCR analizu, u konačnoj zapremini od 10 µl korišćenjem RT2SYBR Green qPCR Mastermix (Applied Biosystem), koji predstavlja univerzalni reagent za PCR analizu i vezuje se za dvolančanu zavojnicu DNK i pojačava se signal fluorescence. RT-PCR umnožavanje je sprovedeno u ABI 7500 termičkoj cikličnoj mašini (Applied Biosystems) u automatski podešenom cikličnom režimu (30 min na 50 °C, 15 min na 95 °C, praćeno sa 40 ciklusa 60 s na 94 °C, 60 s na 57 °C, 60 s na 72 °C, i onda inkubirano 10 min na 70 °C). Rezultati dobijeni qRT-PCR metodom su obrađeni pomoću RQ Study softvera za 7000 v 1.1 SDS instrument, sa nivoom pouzdanosti od 95% (P <0,05). Kvantifikacija je urađena  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  metodom (Livak, 2001), i promene u nivoima iRNK su prikazane relativno u odnosu na kontrolnu vrednost. Unutrašnja kontrola je bio *Hprt* gen u odnosu na koji je određena ekspresija u svakoj od eksperimentalnih grupa, dok je grupa stara četiri meseca bila osnov za poređenje ostalih grupa životinja. Sekvence prajmera koje smo koristili su prikazane u Tabeli 3 (napravio Vivogen, Srbija).

**Tabela 3.** Sekvence prajmera za ekspresione studije. F – napredni prajmer; R – reverzni prajmer

<i>Hmgcr</i>	FTTGGTCCTTGTTCA GCTCAT RTTCGCCAG CCCAAGGA AC
<i>Srebp1-c</i>	FACG GAG CCA TGG ATT GCA RAAGTCACTGTCTTGGTTGTTGATGA
<i>Lxrβ</i>	FAGCGTCCATTTCAGAGCAAGTG R CACTCGTGGACATCCCAGATCT
<i>Abca1</i>	FAGGCCGCACCATTATTTT RGGCAATTCTGTCCCCAAGGAT
<i>ApoE</i>	FGGCCCAGGAGGAGAATCAATGAG RCCTGGCTGGATATGGATGTTG
<i>Mfsd2a</i>	FAGAAGCAGCAACTGTCCATTT RCTCGGCCACAAAAAGGATAAT
<i>Hprt</i>	FCTCATGGACTGATTATGGACAGGAC RGCAGGTCAGCAAAGAACTTATAGCC
<i>Aqp4</i>	FAGCAATTGGATTTTCCGTTG RTGAGCTCCACATCAGGACAG
<i>Sox9</i>	FCACACGTCAAGCGACCCATGAA RTCTTCTCGCTCTCGTTCAGCAG
<i>Otx2</i>	FGGAAGCACTGTTTGCCAAGACC RCTGTTGTTGGCGCACTTAGCT
<i>Lhx2</i>	FGATGCCAAGGACTTGAAGCAGC RTTCCTGCCGTAAGGTTGCGC
<i>Rpe65</i>	FAAGGCTCCTCAGCCTGAAGTCA RGAGAACCTCAGGTTCCAGCCAT
<i>Best1</i>	FCATCAGCACCTCGGTCTACAAG RGACAAGTTGGCAAACCACACCC
<i>Rdh5</i>	FCTGTGACCAACCTGGAGAGTCT RGATGCGCTGTTGCATTTTCAGGT
<i>Rlbp1</i>	FGAAGATGGTGGACATGCTCCAG RCCAGGTCATCTCCGTGAACAAAG
<i>Rbp1</i>	FGCAAAAGACGAACCCCAAAGCGGAC RTCCTGCGTGAGACACTTCTCTGTC

<i>Rgr</i>	FGCCAGCAA GGAGTGACCATTTA RAAAGGAGAGACCTAGCTTCAGAG
<i>Dct</i>	FGCAAGATTGCCTGTCTCTCCAG RCTTGAGAGTCCAGTGTTCCGTC
<i>Tyr</i>	FCAGGCTCCCATCTTCAGCAGAT RATCCCTGTGAGTGGACTGGCAA
<i>TyrP1</i>	FAACTCATGCGTGAGCAGATG RTACCTGGTGCCTCTGAGCTT
<i>Cyp27</i>	FTCAGGAGACCATCGGCACCTTT RCCAGTCACTTCCTTGTGCAAGG
<i>Cyp46</i>	F CTCAGGACGATGAGGTTCTGCT R TGGCGAGACAACCTCCATCACTG

### 3.7. Western blot analiza

Za dobijanje ukupnih proteina mrežnjače i MPE, tkivo je homogenizovano i sonifikovano u deset puta većoj zapremini pufera za liziranje (RIPA puffer: 50 mM Tris-HCl; pH = 7,5; 150 mM NaCl; 1% NP-40; 0,1% SDS; 0,5% Triton X-100; 1 mM EDTA i 1 mM EGTA), u koji je na 10 ml dodata po jedna tableta komercijalno dostupnog koktela inhibitora proteaza i fosfataza (Merck SA, Darmstadt, Nemačka, complete™ Protease Inhibitor Cocktail Complete™ 11697498001). Nakon 30 min inkubacije na ledu, lizati su centrifugirani 14000 g tokom 30 min na +4 °C. Supernatanti su odliveni i čuvani na -80 °C do dalje analize. Koncentracije ukupnih proteina određene su kolorimetrijskom metodom po *Pierce*-u upotrebom komercijalnog kompleta (Pierce Micro BCA Protein Assay Kit Product No. 2323, Merck SA, Darmstadt, Nemačka). Koncentracija svakog uzorka određena je spektrofotometrijskim merenjem (A562 nm), na osnovu standardne krive dobijene upotrebom poznatih koncentracija albumina proteina goveđeg seruma.

#### 3.7.1. Elektroforetsko razdvajanje proteina na poliakrilamidnom gelu

Elektroforetsko razdvajanje proteina prema molekularnoj masi vršeno je na SDS denaturišućim poliakrilamidnim gelovima (engl. *Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*; SDS-PAGE). Korišćena je mini aparatura za elektroforezu (MiniPROTEAN II Electrophoresis Cell, Bio-Rad Laboratories, 1652960). Gel za razdvajanje je, pored akrilamida/bisakrilamida (Sigma) u odnosu 29:1 (finalne koncentracije 10%), sadržao i 1,5 M Tris HCl (pH = 8,8) i 10% SDS. Gel za koncentrisanje je bio sledećeg sastava: 5% akrilamid/bisakrilamid (29:1); 0,5 M Tris-HCl, pH = 6,8 i 10% SDS. Za polimerizaciju gelova (i za razdvajanje i za koncentrisanje) je korišćeno 100 µl 10% amonijum persulfata i 4 µl tetrametiletilendiamina - TEMED (Serva) na 10 ml rastvora. Kao pufer za nalivanje korišćen je *Laemmli* pufer (2x koncentrovan: 31,25 mM Tris, pH = 6,8; 10% glicerol; 1% SDS; 5% 2-merkaptoetanol; 0,025% bromfenol plavo) koji je dodavan uzorku u zapreminskom odnosu 1:1. Uzorci su pre nalivanja dodatno termički denaturisani 4 min na temperaturi od 95 °C. Kao standard za molekularnu masu proteina korišćen je marker širokog opsega (25-250 kDa, Thermo Scientific, Litvanija). Elektroforeza je vršena u puferu za elektroforezu standardnog sastava (192 mM glicin; 25 mM Tris, pH = 8,3; 0,1% SDS) pod konstantnim naponom od 120 V na sobnoj temperaturi. Nalivane su jednake količine proteina po bunariću (15µg).

### 3.7.2. Prenos proteina sa SDS-poliakrilamidnog gela na membranu

Proteini sa poliakrilamidnog gela su preneseni na polivinildefluoridne membrane (PVDF) (Amersham Bioscience) korišćenjem sistema za transfer (Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell, BioRad Laboratories). Nakon završene elektroforeze, gel za razdvajanje je pažljivo uklonjen sa staklene ploče, prenesen u posudu sa puferom za transfer (20% metanol; 192 mM glicin; 25 mM Tris, pH 8,3) i ekvilibrisan narednih 15 min. Isečena u dimenzijama gela, membrana je prvo aktivirana u metanolu 20 s, oprana u dejonizovanoj vodi 20 s, a potom je prebačena u posudu sa puferom za transfer, u kojoj je ekvilibrisana narednih 15 min. Pomoćne komponente, poput filter papira, papira „watman” i suđera, pripremljene su potapanjem u pufer za transfer, takođe, 30 min. Nakon slaganja svih komponenti u kasetu za transfer i njenog potapanja u tank sa puferom, elektrotransfer proteina je vršen pod konstantnim naponom od 30 V tokom noći na +4 °C. Po završenom transferu, membrane su, bez dodatnog ispiranja, 2 sata sušene na sobnoj temperaturi. Potom su membrane aktivirane 20 s u 100% metanolu, isprane u vodi i prebačene u posudu sa bojom Ponso S (*Ponceau S*; 1% boja Ponso S; 5% glacijalna sirćetna kiselina; dejonizovana voda) radi vizuelizacije proteinskih traka. Membrane su bile potopljene u Ponso S 20 minuta, a zatim su odbojene u vodi tako da su obojene proteinske trake bile jasno vidljive, a ostaci boje oko traka svedeni na minimum. Membrane su skenirane i kao takve korišćene za analizu količine nanetih proteina.

### 3.7.3. Imunološka detekcija imobilizovanih proteina

Proteini imobilizovani na PVDF membranama su prethodno pripremljeni za imunološku detekciju. Membrane su prvo kvašene u 20% metanolu 20 s i ispirane u dejonizovanoj vodi 20 s, a zatim su blokirane u 5% rastvoru obranog mleka u Tris- puferisan rastvor (eng. *Tris-buffered saline*, TBS) sa dodatkom deterđenta Tween-20 (TBST: 20 mM Tris-HCl; pH = 7,6; 137 mM NaCl; 0,05% Tween 20). Blokiranje membrane je trajalo 1 h na sobnoj temperaturi, da bi se smanjio intenzitet nespecifičnog vezivanja antitela. Nakon blokiranja, membrane su ispirane u TBST puferu 5 min. Nakon ispiranja membrane su inkubirane sa zečijim monoklonskim MFSD2A (1:8000, 10539, Abcam), mišjim monoklonskim ABCA1 (1:500, #18180, Abcam), 6E10 (1:1000, 803003, Biolegend), SPH (1:1000, S 5768, Sigma), GFAP (1:1000, MAB 360, Millipore), i zečijim poliklonskim primarnim HMGCR (1:1000, # 174830, Abcam) u TBST-u, preko noći na +4 °C. Membrane su onda inkubirane u HRP obeleženom anti-mišjem (1:3000; sc-2370, Santa Kruz) i anti-zečijem sekundarnom antitelu (1:5000; sc-2370, Santa Kruz) 1 h u TBST na sobnoj temperaturi. Signal je detektovan pomoću analize ekspozicije autoradiografskog (pojačana hemiluminiscencija, ECL, Amersham Bioscience) filma (Kodak) osetljivog na plavu svetlost u trajanju od 10 sekundi do 10 minuta. Filmovi su razvijeni odmah nakon završetka ekspozicije membrane i skenirani za dalju analizu.

### 3.7.4. Semikvantitativna analiza imunoblotova

Intenzitet signala dobijenih na autoradiografskom filmu je kvantifikovan denzitometrijski, korišćenjem kompjuterskog programa za analizu signala (Image Quant 5.0). Vrednosti dobijene za ciljne proteine su normalizovane u odnosu na vrednosti koje su dobijene za Ponceau S (35-110 kDa), koje su bile merilo ukupne nanete količine proteina. Tako dobijene relativne vrednosti su dalje korišćene za statističku obradu rezultata i njihovo grafičko predstavljanje.

### 3.8. Imunohistohemijska analiza

Oči su nakon izolacije fiksirane u 4% paraformaldehidu na 4 °C preko noći, nakon čega su dehidratirane u 30% saharozu 24 h i ukalupljene u smesi koju čine 7,5% želatin i 15% saharoza. Nakon toga su na kriotomu (Leica, Nemačka) sečeni preseki mrežnjače debljine 12 µm. Čitav postupak imunocitohemijskog bojenja, osim inkubacije u primarnom antitelu, rađen je na sobnoj temperaturi, a rastvori su pravljani u PBS (pH = 7,4). Pločice sa presecima pripremanim za svetlosnu mikroskopiju su najpre isprane 3 puta po 5 min u PBS-u, a potom su preseki inkubirani 15 min u 0,1% rastvoru deterdženta Triton-X 100, da bi se olakšao prolazak antitela kroz membranu ćelija. Kako bi se sprečilo nespecifično vezivanje antitela, preseki su inkubirani u 5% serumu kože (Dako). Višak rastvora za blokiranje je uklonjen kratkim ispiranjem u PBS-u, a zatim je na ovako pripremljene preseke nakapan rastvor primarnog antitela u PBS. Primarna antitela koja su korišćena za analizu su bila zečije poliklonsko MFSD2A (1:100, 10539, Abcam), mišje monoklonsko SOX9 (1:100, sc-166505, Abcam), mišje monoklonsko anti-β-amiloid, clon 6E10 (cat#803003, Biolegend, San Diego, CA, SAD), i zečije poliklonsko AQP4 (1:500, AB3594, EMD Millipore, Burlington, MA, SAD). Krvni sudovi su obeleženi sa 488-konjugovanim Lycopersicon esculentum lectin (Vector, 488 DL1174), istovremeno sa primarnim antitelima (6E10, AQP4 ili MFSD2A). Preseki su nakon inkubacije u primarnom antitelu ispirani u PBS-u sa dodatkom 1% triton, pa inkubirani sa anti-zečijim, anti-mišijim ili anti-kozijim sekundarnim antitelom koje je konjugovano sa Alexa 568, (Invitrogen) korišćeno u koncentraciji 1:500 u PBS na 2 h na sobnoj temperaturi. Posle ispiranja u PBS, pločice su pokrivene sa DAPI medijumom (Sigma, SAD) i slikane putem fluorescentne mikroskopije. Rezultati koji su prikazani pomoću slika sa mikroskopa su reprezentativna zapažanja sprovedena na 3 različita bojenja za svaku grupu (n=4). Za bojenje amiloidnih plaka je korišćen tioflavin S (ThS). Pločice su inkubirane u 0,001% rastvoru ThS i 50% etanolu tokom 8 min na sobnoj temperaturi. Obojene pločice su na kratko isprane u 80% i 96% etanolu nakon čega su isprane destilovanom vodom i pokrivene sa DAPI medijumom (Sigma, SAD) i slikane putem fluorescentne mikroskopije. Mikrografije su slikane na Axio Observer Mikroskopu (Z1 AxioVision 4.6 software system, Carl Zeiss, Nemačka) na 20x uveličanju. Rezultati koji su prikazani pomoću slika sa mikroskopa su reprezentativna zapažanja sprovedena na 3 različita bojenja za svaku grupu (n=4).

#### 3.8.1. Statistička analiza imunobojenja krvnih sudova

Kvantifikacija imunobojenja krvnih sudova je urađena sa reprezentativnih mikrografija uslikanih na Zeiss mikroskopu na 20x uveličanju. Uslovi su bili identični za sve grupe. Lektin-pozitivni regioni su analizirani merenjem lektinom obeleženog regiona (Otsu,

ImageJ, verzija 1,74). Sa svake pločice (n=4 po grupi) je analizirano po pet polja sa 3 različita preseka mrežnjače. Softver je analizirao svaki presek. Određen je prag intenziteta fluorescencije. Granična vrednost praga fluorescencije je određena automatski. Na osnovu datih paramatera je računata površina pokrivena fluorescencijom.

### 3.9. Statistička analiza

Podaci su analizirani pomoću *GraphPadPrism* programa (GraphPad Software, Inc., SAD). Za poređenje dve eksperimentalne grupe smo koristili neparametrijski Man-Whitney U-test, uzimajući u obzir da podaci ne ispunjavaju uslov normalne raspodele. Za poređenje više grupa u isto vreme, koristili smo dvosmernu analizu promeljivosti (ANOVA) sa urađenim Tukey *post-hoc* testom. Razlike su smatrene statistički značajnim kada je  $p < 0,05$ .

## 4. REZULTATI

### I DEO

#### 4.1. Promene u mrežnjači u fiziološkom i patološkom starenju

##### 4.1.1. Analiza ćelijskih markera u mrežnjači u fiziološkom i patološkom starenju

Promene u mrežnjači mogu biti povezane kako sa starenjem tako i sa nakupljanjem A $\beta$  (Wang i sar., 2021). Zato je u mrežnjačama WT i 5XFAD miševa ispitano kako se menjaju markeri glijskih ćelija (SOX9, GFAP) kao i markeri sinaptičke plastičnosti i neurodegeneracije (sinaptofizin, SPH, antitelo na fosforilisanu subjedinicu neurofilamenta velike molekulske mase (NF-H) SMI-31).

Specifičan tip glijskih ćelija u mrežnjači su ćelije Milerove glije (MG). SOX9 je karakterističan postnatalni marker ovih ćelija koji je neophodan i dovoljan za njihovu proliferaciju (Poché i sar., 2008). Na Slici 8 E prikazane su mikrofografije imunofluorescentno obojenih preseka mrežnjače životinja iz sve četiri ispitivane grupe korišćenjem antitela na SOX9 i boje DAPI koja boji jedra ćelija. Crvenom bojom obeležen je SOX9 protein u telima MG koja se jasno uočavaju u UNS mrežnjače, dok plavi signal predstavlja obojena jedra ćelija u UNS i SNS. Kvantifikacijom ovih imunofluorescentno obeleženih preseka mrežnjače miševa (postupak prikazan u Materijal i metode) pokazano je da nema razlike u ekspresiji Sox9 proteina u MG među ispitivanim grupama i da nema promena u broju i distribuciji ćelija MG u toku fiziološkog i patološkog starenja (Slika 8 F).

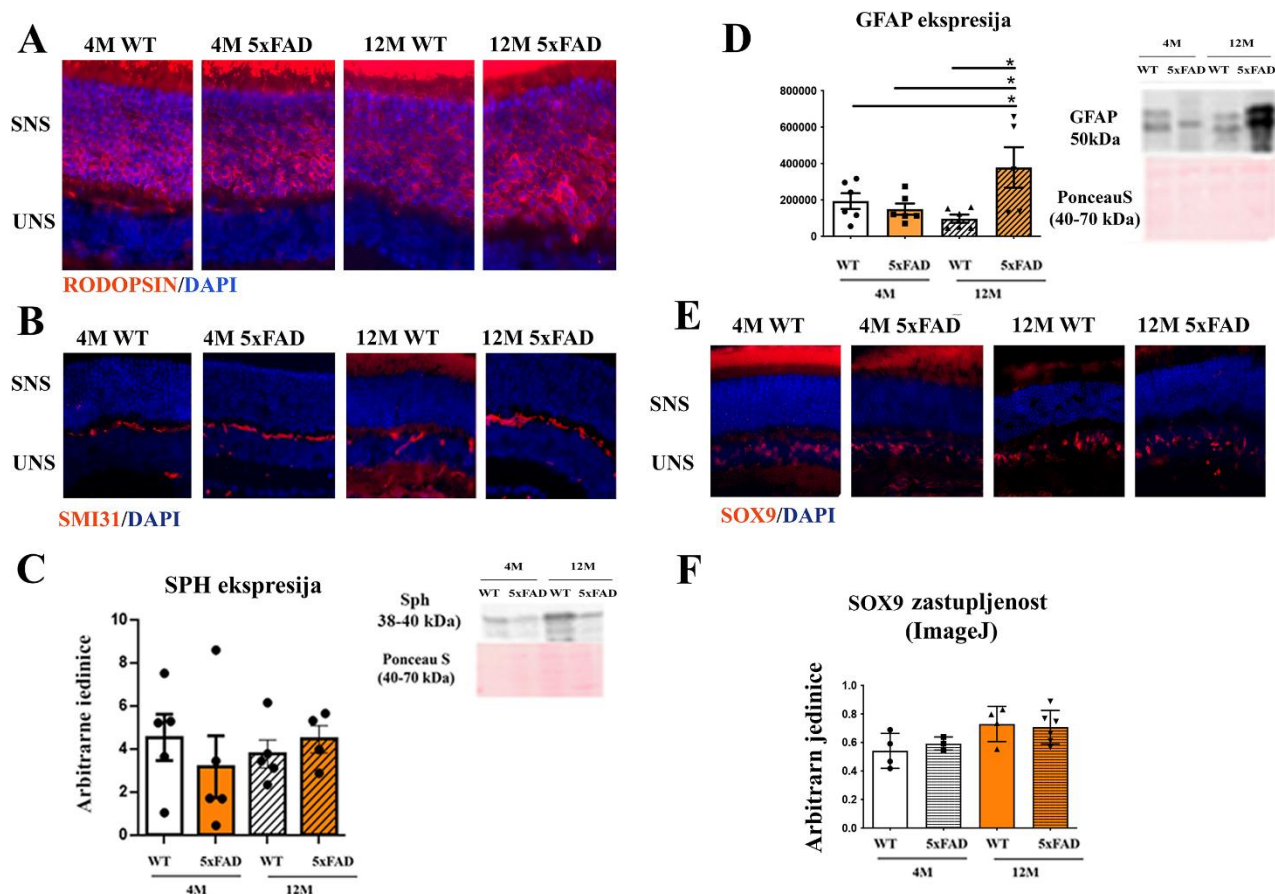
Glijski fibrilarni kiseli protein (GFAP) se u CNS eksprimira u astrocitima i njegova ekspresija je povećana tokom procesa neurodegeneracije nastale starenjem (Ferrer i sar., 2018). Ispitano je kako se ekspresija GFAP proteina menja u mrežnjači tokom prirodnog i patološkog starenja (Slika 8 D). Western blot analiza je pokazala da dolazi do značajnog porasta proteinske ekspresije u 12M 5XFAD u odnosu na ostale ispitivane grupe (2,33 puta u odnosu na 4M WT, 2,41 put u odnosu na 4M 5XFAD, 2,71 put u odnosu na 12M WT). Rezultati analize dvosmernom ANOVA pokazuju da faktor genotip ima najveći uticaj ( $F_{\text{genotip}} = 13,95$ ;  $p = 0,0018$ ), zatim faktor starosti ( $F_{\text{starost}} = 13,33$ ;  $p = 0,0022$ ), a i interakcija faktora je takođe imala statistički značajan uticaj na nastale promene u mrežnjači ( $F_{\text{starost} \times \text{genotip}} = 11,30$ ;  $p = 0,0040$ ). Dobijene razlike su u skladu sa prethodno opisanim promenama koje nastaju kod neurodegenerativnih bolesti CNS-a (Rodríguez i sar., 2014).

Poznato je da u toku starenja dolazi do degeneracije neurona i do promena u ekspresiji markera sinaptičke plastičnosti u mozgu (Gall, 2006; Bergado i Almaguer., 2002). Slične promene su pokazane i kod životinjskih modela AB (Burke i Barnes, 2006; Mattson i Arumugam, 2018; Shetty i sar., 2015). Da bi se ispitalo da li dolazi do degeneracije neurona u mrežnjači tokom fiziološkog i patološkog starenja rađeno je imunohistohemijsko bojenje sa anti-SMI31 antitelom, markerom neuronalne degeneracije. Antitelo na fosforilisanu subjedinicu neurofilamenta velike molekulske mase (NF-H), SMI31, prepoznaje neurofilamente fosforilisanih proteina u neuronima, aksonima, dendritima i neurofibrilarnim klubadima kod brojnih vrsta i akumulira se u neuronima koji degenerišu (Kim i sar., 2000). Kvalitativna analiza rezultata je pokazala da dolazi do pojave distrofije neurita u 12M starim 5XFAD mrežnjačama (Slika 8 B).

Fotoreceptori su organizovani u SNS i primećeno je da dolazi do povećanja ovog sloja kod 5xFAD životinja (Zhang i sar., 2021). Bojenje anti-Rodopsin antitelom (obeleženo

crvenim, Slika 8A) je pokazalo da dolazi do povećanja SNS i kod fiziološkog i patološkog starenja ali da je efekat izraženiji u 12M 5XFAD mrežnjačama što je u skladu sa objavljenim rezultatima.

Kao marker sinaptičke plastičnosti u mrežnjači je korišćen sinaptički vezikularni protein, sinaptofizin (SPH). Rađena je Western blot analiza proteinske ekspresije SPH proteina u mrežnjači tokom fiziološkog i patološkog starenja. Statistička analiza dvosmernom ANOVA je pokazala da nema razlike u ekspresiji SPH u sve četiri ispitane grupe (Slika 8 C).



**Slika 8.** Proteinska ekspresija različitih ćelijskih markera u mrežnjači. Reprezentativne mikrofografije imunofluorescentno obeleženih preseka mrežnjače u svim ispitivanim grupama. (A) Imunohistohemijsko bojenje anti-RODOPSIN antitelom (RODOPSIN-crveno, DAPI-plavo). (B) Imunohistohemijsko bojenje anti-SMI31 antitelom (n=3, SMI-31-crveno, DAPI plavo) (C) Western blot analiza ekspresije SPH proteina (n=5) (D) Western blot analiza promena u ekspresionim nivoima GFAP proteina (n=5). (E) Tela Milerove glike sa SOX9 proteinom (anti-Sox9 antitelo, crveno) uočavaju se u UNS, a jedra ćelija (DAPI, plavo) u UNS i SNS. (F) Image J kvantifikacija zastupljenosti SOX9. „Skala” – 50  $\mu$ m. Ispitivane su grupe od 4 i 12 M starih WT i 5XFAD mrežnjača. Prikazani su reprezentativni imunoblotovi. Podaci dobijeni analizom pomoću dvosmerne ANOVA su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  SEM. \* p < 0,05

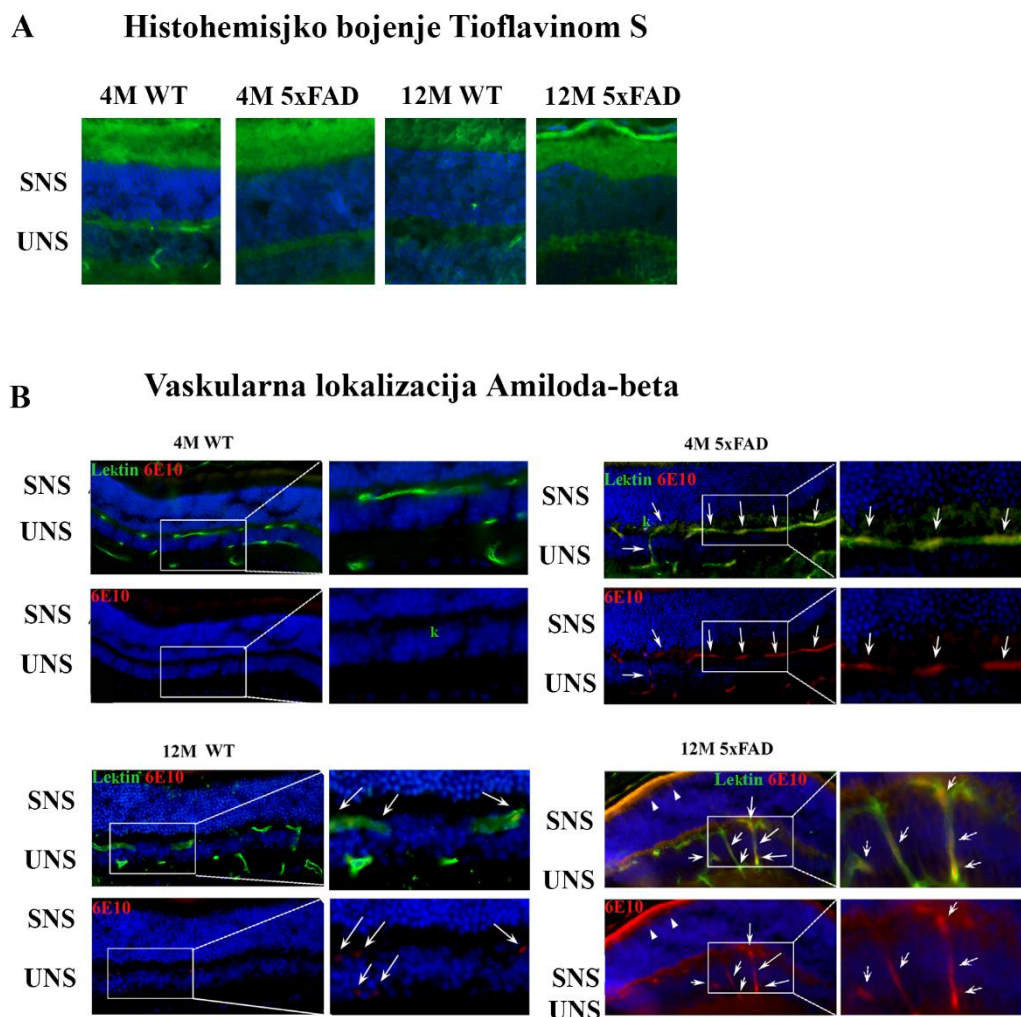
#### 4.1.2. Ekspresija amiloida $\beta$ u mrežnjači tokom fiziološkog i patološkog starenja

5XFAD miševе karakteriše prekomerna proizvodnja APP-a kao posledica 5 mutacija inkorporiranih u genom (Ferrer i sar., 2018). Za razliku od mozga za koji je karakteristično prisustvo amiloidnih plaka, u mrežnjači 5XFAD miševa prisutnost plaka je ili minimalna ili ih uopšte nema. Bojenje Tioflavinom S nije pokazalo prisustvo amiloidnih plaka ni u jednoj od četiri ispitivane grupe (Slika 9 A).

Kako je pokazana zastupljenost A $\beta$  u mrežnjači 5XFAD miševa (Sugasini i sar., 2022) urađena je analiza ekspresije A $\beta$  pomoću imunohistohemijskog bojenja sa anti-A $\beta$



antitelom 6E10 (Slika 9 B, crveno) da bi se lokalizovala njegova ekspresija. Iako bojenje sa 6E10 nije zapaženo u krvnim sudovima mrežnjače kod 4M WT primećeno je njegovo sporadično nagomilavanje u krvnim sudovima 12M WT mrežnjača. Detektovana je jaka kolokalizacija A $\beta$  (crveno) u krvnim sudovima mrežnjače (obeleženi lektinom, zeleno) kod 4M i 12M 5XFAD mrežnjača.

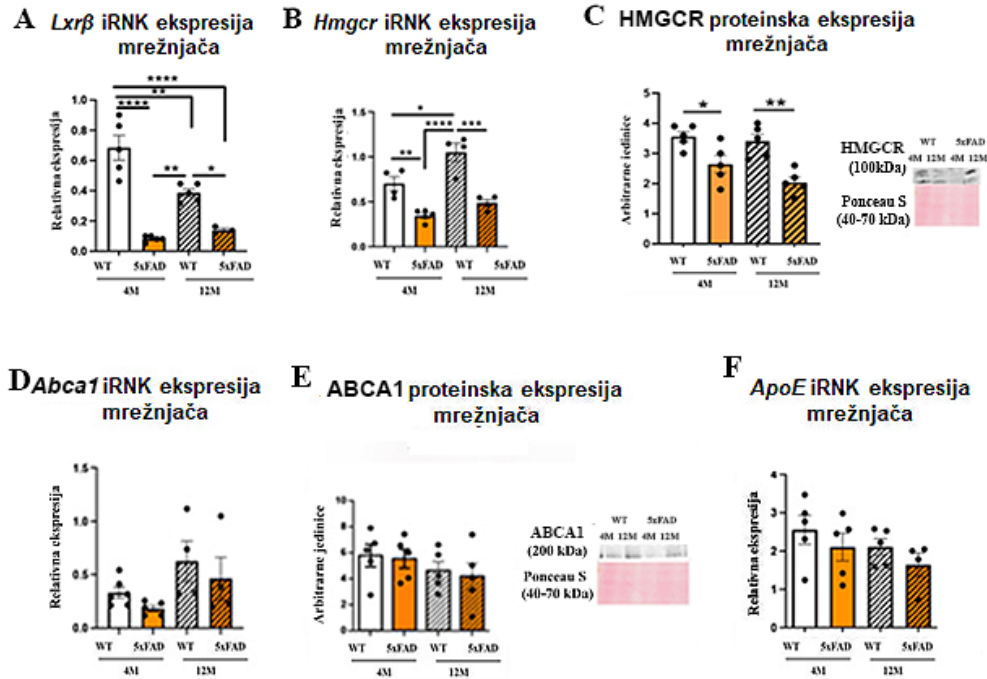


**Slika 9.** Analiza prisustva amiloidnih plaka i A $\beta$  tokom fiziološkog i patološkog starenja u mrežnjačama 4M i 12M starih WT i 5XFAD miševa. (A) Prisustvo plaka je analizirano pomoću Tioflavin S histohemisjskog bojenja (ThS - zeleno, DAPI – plavo, n=3). (B) Proteinska ekspresija A $\beta$  u krvnim sudovima mrežnjače (n=4). Kolokalizacija je primećena u krvnim sudovima kod 4M i 12M 5XFAD mrežnjača i sporadično u 12M WT mrežnjačama (strelice). (anti – A $\beta$ , 6E10 – crveno, Lektin – zeleno, DAPI – plavo). Ispitivane su grupe od 4 i 12 M starih WT i 5XFAD mrežnjača. „Skala” – 50  $\mu$ m.

### 4.1.3. Promene ekspresije gena uključenih u metabolizam holesterola u mrežnjači

Primećeno nakupljanje A $\beta$  u krvnim sudovima ukazuje na promenjenu propustljivost KMrB. S obzirom da su promene u lipidnom sastavu prepoznate kao važan faktor u regulaciji transcitoze i propustljivosti KMB i KMrB (Pulgar, 2019) analizirani su nivoi ekspresije ključnih gena koji regulišu sintezu i transport holesterola. Analizirana je ekspresija *Lxr $\beta$* , koji je odgovoran za integraciju puteva za ulaz i izlaz holesterola (Zheng i sar., 2012), i *Hmgcr* iRNK i HMGCR proteina, koja je ograničavajući enzim u sintezi holesterola (Luo i sar., 2020) u mrežnjači 5XFAD i miševa divljeg soja (engl. wild type, WT). qRT-PCR analiza je pokazala da je nivo ekspresije *Lxr $\beta$*  smanjen u mrežnjači 5XFAD miševa u obe starosne grupe u poređenju sa 4M WT mrežnjačama (8,32 i 4,92 puta smanjenje, redom) (Slika 10 A). Iako je ekspresija *Lxr $\beta$*  smanjena i u 12 M WT i u 12 M 5XFAD mrežnjačama (1,77 i 4,92 puta, redom, u poređenju sa 4 M WT), efekti su bili izraženiji kod 12 M 5XFAD miševa (2,79 puta pad u poređenju sa 12 M WT). Analiza dvosmernom ANOVA je pokazala da su promene u ekspresiji *Lxr $\beta$*  značajno pogođene sa oba faktora (starost i genotip), kao i sa interakcijom faktora, ali je genotip imao najveći uticaj ( $F_{\text{genotip}} = 71,91$ ;  $p < 0,0001$ ), zatim interakcija faktora ( $F_{\text{starost} \times \text{genotip}} = 12,54$ ;  $p = 0,0033$ ), a najmanji uticaj je pokazao faktor starenja ( $F_{\text{starost}} = 5,825$ ;  $p = 0,0301$ ). Nasuprot *Lxr $\beta$*  ekspresiji *Hmgcr* u mrežnjači WT životinja se povećava sa starenjem (Slika 10 B), dok je ekspresija *Hmgcr* u 5xHAD mrežnjačama imala sličan obrazac kao i za *Lxr $\beta$* . Najveći pad je primećen kod 4M 5XFAD mrežnjača (2,04 puta u odnosu na 4M WT) (Slika 10 B). Starenje je indukovalo ekspresiju *Hmgcr* kod 12M WT (1,48 rast u poređenju 4M WT), ali rast nije primećen kod 12M 5XFAD (2,14 puta pad u poređenju sa 12M WT i 30% smanjenje u poređenju sa 4M WT) (Slika 10 B). Dvosmerna ANOVA je pokazala da je genotip imao jači uticaj na ekspresiju *Hmgcr* ( $F_{\text{genotip}} = 50,58$ ;  $p < 0,0001$ ) nego faktor starenja ( $F_{\text{starost}} = 14,46$ ;  $p = 0,0022$ ). Međutim, interakcija oba faktora nije pokazala statističku značajnost ( $F_{\text{starost} \times \text{genotip}} = 2,510$ ;  $p = 0,1371$ ). Proteinska ekspresija HMGCR je pokazala smanjenje ekspresije u 12 M i kod fiziološkog i patološkog starenja (Slika 10 C). Najveći uticaj je imao faktor starenja ( $F_{\text{starost}} = 56,81$ ;  $p < 0,0001$ ), dok faktor genotipa, kao ni interakcija faktora nisu imali značajnog uticaja na promene proteinske ekspresije.

Ispitano je da li fiziološko i patološko starenje utiču na ekspresiju gena koji regulišu transport holesterola u mrežnjači. Čelije recikliraju holesterol kroz vrlo efikasan apolipoprotein-zavistan proces. Najprisutniji je apolipoprotein E (APOE). Proces lipidacije je posredovan sa ABCA1, koji se nalazi u ćelijskoj membrani i zadužen je za izbacivanje fosfolipida i holesterola iz mnogih ćelija (Petrov i sar., 2019). qRT-PCR analiza je pokazala da ekspresija *Abca1* i *ApoE* iRNK u mrežnjači nije promenjena ni u jednoj od ispitivanih grupa (Slika 10 D, F). Takođe, analiza proteinske ekspresije ABCA1 u mrežnjači je pokazala da ne dolazi do promene njegove zastupljenosti ni u jednoj od ispitivanih grupa (Slika 10 E).



**Slika 10.** Analiza ekspresionih nivoa gena i proteina koji regulišu sintezu i transport holesterola u mrežnjači 4M i 12M WT i 5XFAD miševa. qRT-PCR analiza ekspresije (A) *Lxrβ* i (B) *Hmgcr* u mrežnjači (n=5). (C) Western blot analiza ekspresije HMGCR proteina u mrežnjači (n=5). qRT-PCR analiza ekspresije (D) *Abca1* i (F) *ApoE* gena u mrežnjači (n=5) (E) Western blot analiza ekspresije ABCA1 proteina u mrežnjači (n=5). Ispitivane su grupe od 4 i 12 M starih WT i 5XFAD mrežnjača. Prikazani su reprezentativni imunoblotovi. Statistička obrada rezultata je urađena pomoću dvosmerne ANOVA. Podaci su predstavljeni kao srednja vrednost ± SEM. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

#### 4.1.4. Ekspresija MFSD2A tokom fiziološkog i patološkog starenja

Jedan od mehanizama odgovornih za regulaciju propustljivosti KMrB je transcitoza čiji je ključni regulator MFSD2A protein (Wang i sar., 2020; Zhao i Zloković, 2014). U mrežnjači MFSD2A<sup>-/-</sup> životinja (Zhang i sar., 2021, Zhao i Zloković, 2014) je primećena poremećena ekspresija gena koji regulišu sintezu holesterola, ukazujući na moguću regulaciju između *Mfsd2a* i metabolizma holesterola. Primećene značajne promene u ekspresiji ključnih gena koji regulišu sintezu holesterola u mrežnjači tokom starenja kako kod WT tako i kod 5XFAD, kao i pokazano nagomilavanje A $\beta$  u krvnim sudovima ukazuju na poremećaje u funkcionisanju KMrB.

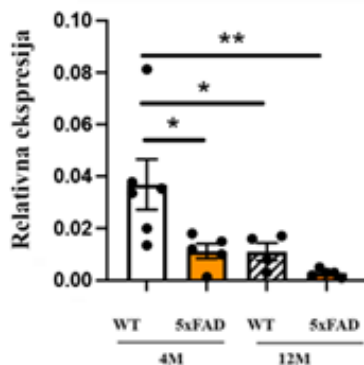
MFSD2A se u mrežnjači primarno eksprimira u endotelnim ćelijama (Lobanova i sar., 2019). S obzirom na to da je pokazano da je ugrožen integritet KMrB u fiziološkom starenju kao i kod pacijenata obolelih od AB i kod animalnih modela AB (Mirzaei i sar., 2020) ispitano je kako se menja ekspresija *Mfsd2a* iRNK i MFSD2A proteina u okviru ispitivanih eksperimentalnih grupa. Smanjenje ekspresije *Mfsd2a* iRNK je primećeno u fiziološkom starenju, kod 12M WT (3,35 puta) u odnosu na 4M WT. Primećen je značajan pad nivoa ekspresije *Mfsd2a* iRNK u mrežnjačama 5XFAD (3,27 puta) i 12M 5XFAD mrežnjača (13,15 puta) u odnosu na WT kontrole (Slika 11 A). Analiza dvosmernom ANOVA je pokazala da su efekti starosti i genotipa na smanjenu ekspresiju *Mfsd2a* iRNK bili slični ( $F_{\text{starost}} = 7,407$ ;  $p = 0,0151$ ;  $F_{\text{genotip}} = 7,201$ ;  $p = 0,0163$ ), dok interakcije ovih faktora nisu imale efekta ( $F_{\text{starost} \times \text{genotip}} = 1,913$ ;  $p = 0,1856$ ).

Pokazano je da SREBP1-C može regulisati ekspresiju MFSD2A (Zhang i sar., 2021) tako što smanjenje ekspresije SREBP1-c dovodi do povećanja ekspresije MFSD2A i obrnuto (Silver i sar., 2000). S obzirom da dolazi do značajnog pada u ekspresiji *Mfsd2a* iRNK u ispitivanim eksperimentalnim grupama u poređenju sa 4M WT ispitali smo kako se menja ekspresija *Srebp1-c* iRNK u mrežnjači u fiziološkom i patološkom starenju. Analiza ekspresije *Srebp1-c* iRNK je pokazala značajan porast *Srebp1-c* ekspresije kod 4M 5XFAD miševa u odnosu na kontrolne 4M WT miševe (1,84-puta porast, Slika 11 B) što ukazuje na mogući mehanizam regulacije *Mfsd2a* ekspresije u ovoj eksperimentalnoj grupi. Odsustvo promena ekspresije *Srebp1-c* u 12 M WT i 5XFAD ukazuje na postojanje drugih mehanizama koji dovode do pada ekspresije *Mfsd2a* kod tokom starenja. Analiza dvosmernom ANOVA je pokazala da ni starost ni genotip nisu imali značajan efekat na *Srebp1-c* ekspresiju dok je interakcija ova dva faktora imala jak efekat ( $F_{\text{starost} \times \text{genotip}} = 9,426$ ;  $p = 0,0078$ ).

Promene u ekspresionim nivoima MFSD2A proteina se poklapaju sa pokazanim promenama u ekspresiji *Mfsd2a* iRNK (Slika 11 C). Analiza dvosmernom ANOVA je pokazala pad ekspresije u toku fiziološkog starenja (1,78 puta), a kod transgenih životinja pad je primećen u obe starosne grupe - kod 4M 5XFAD mrežnjača (4,3 puta), 12M 5XFAD mrežnjača (2,54 puta). Efekat genotipa je imao veći uticaj na ekspresiju *Mfsd2a* od efekta starenja ( $F_{\text{genotip}} = 3,51$ ;  $p = 0,0004$ ;  $F_{\text{starost}} = 7,26$ ,  $p = 0,0273$ ). Takođe je primećen i značajan efekat interakcije između starosti i genotipa ( $F_{\text{starost} \times \text{genotip}} = 21,11$ ;  $p = 0,0018$ ).

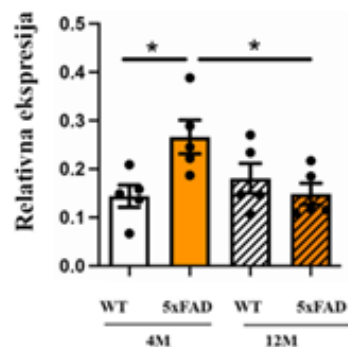
**A**

***Mfsd2a* iRNK ekspresija**



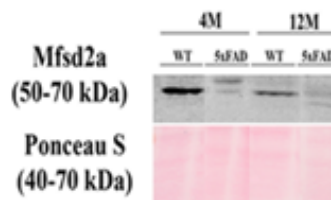
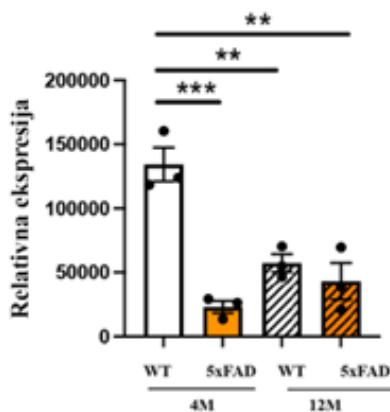
**B**

***Srebp1-c* iRNK ekspresija**



**C**

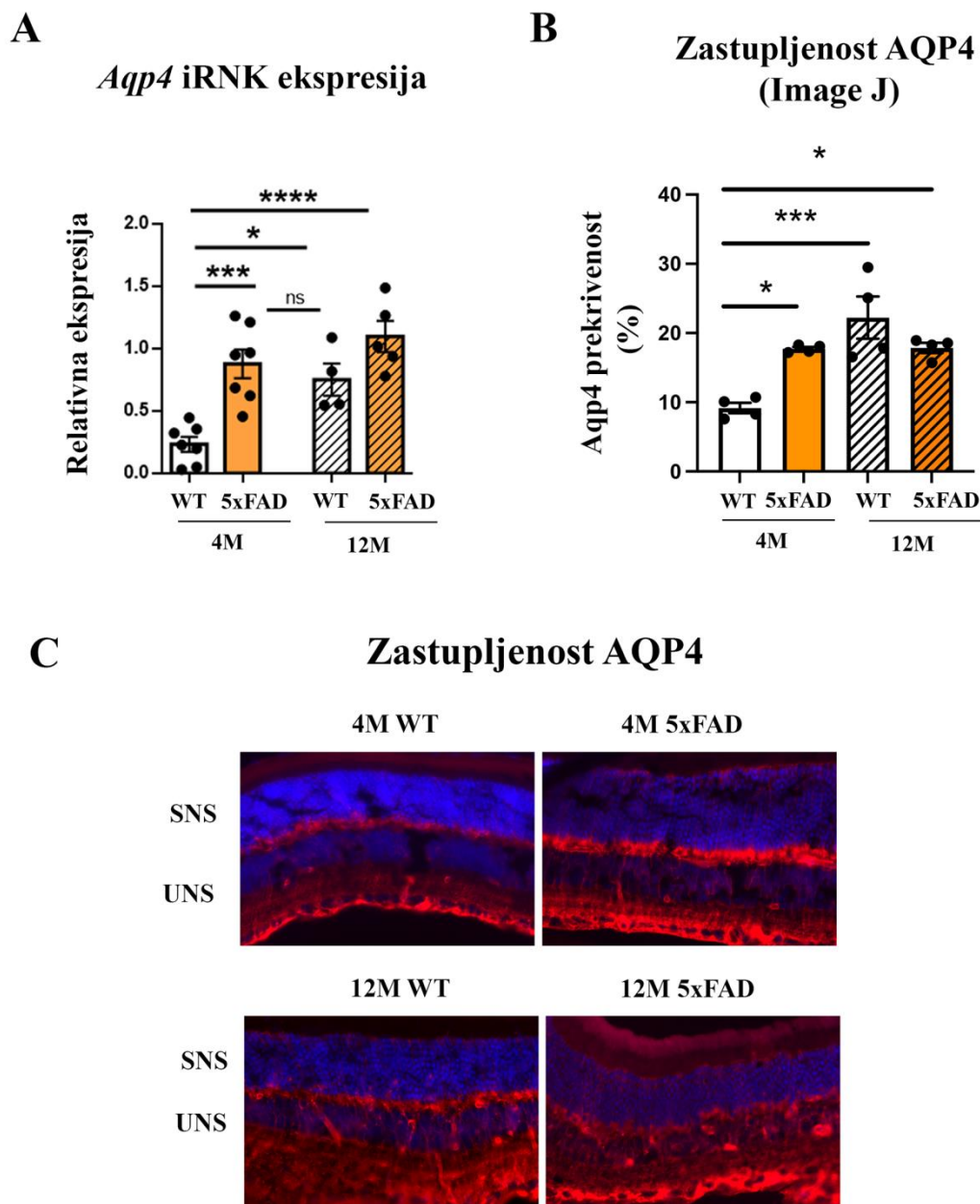
**MFSD2A proteinska ekspresija**



**Slika 11.** Promene u zastupljenosti *Mfsd2a* iRNK i MFSD2A proteina u mrežnjači u toku fiziološkog i patološkog starenja. (A) qRT-PCR analiza ekspresije *Mfsd2a* iRNK (n=6) (B) qRT-PCR analiza ekspresije *Srebp1-c* iRNK (n=5). (C) Western blot analiza ekspresije MFSD2A proteina (n=3). Ispitivane su grupe od 4 i 12 M starih WT i 5XFAD mrežnjača. Prikazan je reprezentativni imunoblot. Analiza rezultata je urađena dvosmernom ANOVA. Podaci su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  SEM. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

#### 4.1.5. Ekspresija AQP4 u mrežnjači tokom fiziološkog i patološkog starenja

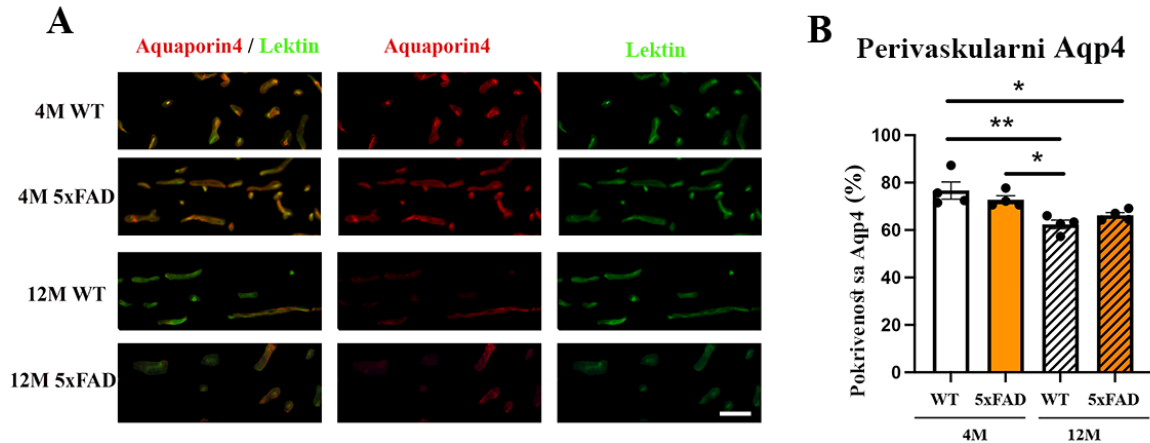
S obzirom da je pokazano da zastupljenost AQP4 raste u toku fiziološkog starenja (Valenza i sar., 2020) kao i sa napredovanjem AB patologije (Zeppenfeld i sar., 2017) izmerena je ekspresija *Aqp4* iRNK i AQP4 proteina u 5XFAD mrežnjačama. Pokazano je da je zastupljenost *Aqp4* iRNK povećana kod 4M 5XFAD i 12M 5XFAD mrežnjača u poređenju sa 4M WT (3,77 i 4,1 puta rast, redom) (Slika 12 A). Starenje je takođe dovelo do povećanja *Aqp4* iRNK ekspresije i pokazan je porast od 3.22 puta u 12M WT mrežnjačama u poređenju sa 4M WT (Slika 12 A). Dvosmerna ANOVA je pokazala da je efekat genotipa na ekspresiju *Aqp4* iRNK ( $F_{\text{genotip}} = 26,7$ ,  $p < 0,0001$ ) jači od efekta starenja ( $F_{\text{starost}} = 10,49$ ;  $p = 0,0046$ ). Interakcija ovih faktora nije uticala na ekspresiju *Aqp4* iRNK ( $F_{\text{starost} \times \text{genotip}} = 3,229$ ;  $p = 0,0891$ ). Proteinska ekspresija AQP4 je merena pomoću ImageJ analize imunohistohemijskog bojenja (Slika 12 B, C). Pokazano je da su nivoi proteinske ekspresije AQP4 povećani u 4M i 12M 5XFAD mrežnjačama u odnosu na 4M WT (ImageJ analiza, 1,93 i 1,94 puta porast, redom, Slika 12 B). Fiziološko starenje je takođe uticalo na povećanje ekspresije AQP4. Pokazano je da je zastupljenost AQP4 kod 12M WT mrežnjača povećana u odnosu na 4M WT (2.42 puta porast;  $F_{\text{starost}} = 16.58$ ,  $p = 0,0015$ ) (Slika 12 B). Iako faktor genotipa nije imao značajan efekat na ekspresiju AQP4 ( $F_{\text{genotip}} = 1,665$ ;  $p = 0,2213$ ), faktor starenja ( $F_{\text{starenje}} = 34,44$ ,  $p = 0,0023$ ) i interakcija faktora ( $F_{\text{starost} \times \text{genotip}} = 15,86$ ;  $p = 0,0018$ ) su imali značajan uticaj na ekspresiju AQP4.



**Slika 12.** Promene u zastupljenosti *Aqp4* iRNK i AQP4 proteina u mrežnjači u toku fiziološkog i patološkog starenja. (A) qRT-PCR analiza ekspresije *Aqp4* iRNK, n=7 (B) Image J kvantifikacija AQP4 ekspresije. (C) Reprezentativno imunobojenje AQP4 u mrežnjači kod 4M i 12M WT i 5XFAD miševa (AQP4-crveno, DAPI-plavo). Ispitivane su grupe od 4 i 12 M starih WT i 5XFAD mrežnjača. Analiza rezultata je urađena dvosmernom ANOVA (n=4). „Skala” – 50  $\mu$ m. Podaci su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  SEM. \* p < 0,05, \*\*\* p < 0,001, \*\*\*\* p < 0.01. ns – nema statističke značajnosti.

AQP4 ekspresija je primećena u neposrednoj blizini krvnih sudova i pokazano je da poremećena perivaskularna lokalizacija AQP4 remeti glimfatičko čišćenje u starenju i kod AB (Kress i sar., 2014). Takođe je pokazano da je smanjena ekspresija AQP4 značajno asocirano sa porastom nakupljanja A $\beta$  u krvnim sudovima (Vanderbroek i Yasui, 2020). Merene su promene u perivaskularnoj lokalizaciji AQP4 u mrežnjačama u ispitivanim eksperimentalnim grupama. (Slika 13 A). Nisu primećene promene u perivaskularnoj lokalizaciji AQP4 u mrežnjačama 4 M 5XFAD u poređenju sa 4M WT (Slika 13 B).

Međutim, primećeno je da se kod WT životinja sa starenjem smanjuje perivaskularna lokalizacija AQP4 (1,21 puta). Isti trend je zadržan i kod 12M 5xFAD ali samo u odnosu na 4M WT kontrolu (1,18 puta), dok u odnosu na 4M 5xFAD smanjenje nije bilo statistički značajno. Dvosmerna ANOVA je pokazala da je jedini efekat na perivaskularnu lokalizaciju AQP4 imao faktor starenja ( $F_{\text{starost}} = 21,15$ ,  $p = 0,0006$ ), dok ni faktor genotipa ni interakcije starosti i genotipa nisu imali uticaja ( $F_{\text{genotip}} = 7,642$ ;  $p = 0,9932$ ,  $F_{\text{starost} \times \text{genotip}} = 2,933$ ;  $p = 0,1125$ ).



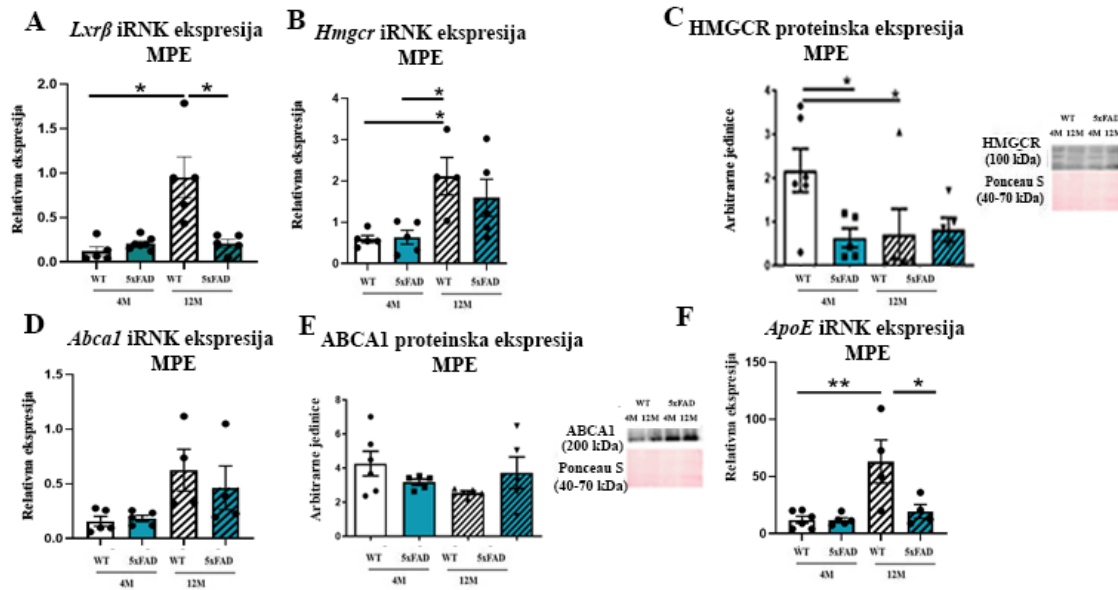
**Slika 13.** AQP4 perivaskularna lokalizacija u mrežnjači u fiziološkom i patološkom starenju. (A) Imunohistohemijška analiza perivaskularne lokalizacije AQP4 u mrežnjači (Aqp4 – crveno, Lektin – zeleno). (B) Kvantifikacija perivaskularne lokalizacije AQP4 je urađena u ImageJ programu, a statistička analiza je urađena pomoću dvosmerne ANOVA. Ispitivane su grupe od 4 i 12 M starih WT i 5XFAD mrežnjača. Rezultati su predstavljani kao odnos vrednosti za AQP4/Lektin bojenja (grafik) ( $n=4$ ). „Skala” – 50  $\mu\text{m}$ . Podaci su predstavljani kao srednja vrednost  $\pm$ SEM. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$

#### 4.1.7. Efekti fiziološkog i patološkog starenja na ekspresiju gena uključenih u metabolizam holesterola i gena vizuelnog ciklusa u MPE-u

Kako se ekspresija gena uključenih u metabolizam holesterola u mrežnjači značajno menja tokom starenja, hteli smo da ispitamo da li je ekspresija ovih gena u MPE-u, koji su fizički i metabolički direktno povezani sa SS mrežnjače, takođe promenjena. Zbog toga je ispitano da li dolazi do promena u ekspresiji gena uključenih u regulaciju sinteze i transporta holesterola u MPE-u. Za razliku od ekspresije u mrežnjači, ekspresija iRNK *Lxr $\beta$*  raste tokom fiziološkog starenja (12M WT) u MPE-u (8,2 puta) (Slika 14 A), dok tokom patološkog starenja (12M 5XFAD) ne dolazi do promena i ekspresija *Lxr $\beta$*  se ne razlikuje od kontrolnih 4M WT miševa. Dvosmerna ANOVA je pokazala da samo faktor starosti ima uticaja ( $F_{\text{starost}} = 55,95$ ;  $p < 0,0001$ ), dok faktor genotipa kao ni interakcija faktora nisu imali uticaja. Analiza iRNK ekspresije *Hmgcr* u MPE-u je pokazala rast samo u 12 M WT u poređenju sa 4 M WT (Slika 14 B). Analiza dvosmernom ANOVA je pokazala da je samo faktor starosti imao uticaja ( $F_{\text{starost}} = 49,04$ ;  $p = 0,0015$ ). Ispitana je i proteinska ekspresija HMGCR u MPE-u kod sve četiri ispitivane grupe Western blot analizom u MPE-u koja je pokazala da dolazi do značajnog smanjenja proteinske ekspresije HMGCR sa fiziološkim starenjem (5,2 puta), kao i niži nivo proteinske ekspresije kod 5XFAD u odnosu na 4 M WT (6,4 puta) (Slika 14 C). Dvosmerna ANOVA je pokazala da najveći uticaj ima interakcija faktora starosti i genotipa ( $F_{\text{starost} \times \text{genotip}} = 6,597$ ;  $p = 0,0206$ ), zatim faktor genotipa ( $F_{\text{genotip}} = 5,272$ ;  $p = 0,0355$ ), dok faktor starosti nije pokazao značajan uticaj.

Ispitali smo da li fiziološko i patološko starenje utiču na ekspresiju gena koji regulišu transport holesterola u MPE-u. qRT-PCR analiza je pokazala da se ekspresija *Abca1* nije značajno promenjena ni u jednoj od ispitivanih grupa (Slika 14 D), dok ekspresija *ApoE*

pokazuje značajan rast sa fiziološkim (5,21 puta), ali ne i sa patološkim starenjem u MPE-u (Slika 14 F). Dvosmerna ANOVA je pokazala da je najveći uticaj imao faktor starenja ( $F_{\text{starost}} = 37,17$ ;  $p = 0,0010$ ), zatim interakcija faktora ( $F_{\text{starost} \times \text{genotip}} = 22,35$ ;  $p = 0,0065$ ), dok faktor genotipa nije imao uticaja. Analiza proteinske ekspresije je pokazala da ne dolazi do promene nivoa ekspresije ABCA1 transportera u MPE-u ni u jednoj od ispitivanih grupa (Slika 14 E). Dvosmerna ANOVA nije pokazala značajne razlike u proteinskoj ekspresiji ABCA1 ni u jednoj od starosnih grupa, ni u zavisnosti od genotipa, a ni interakcija ova dva faktora nije pokazala statističku značajnost u MPE-u.

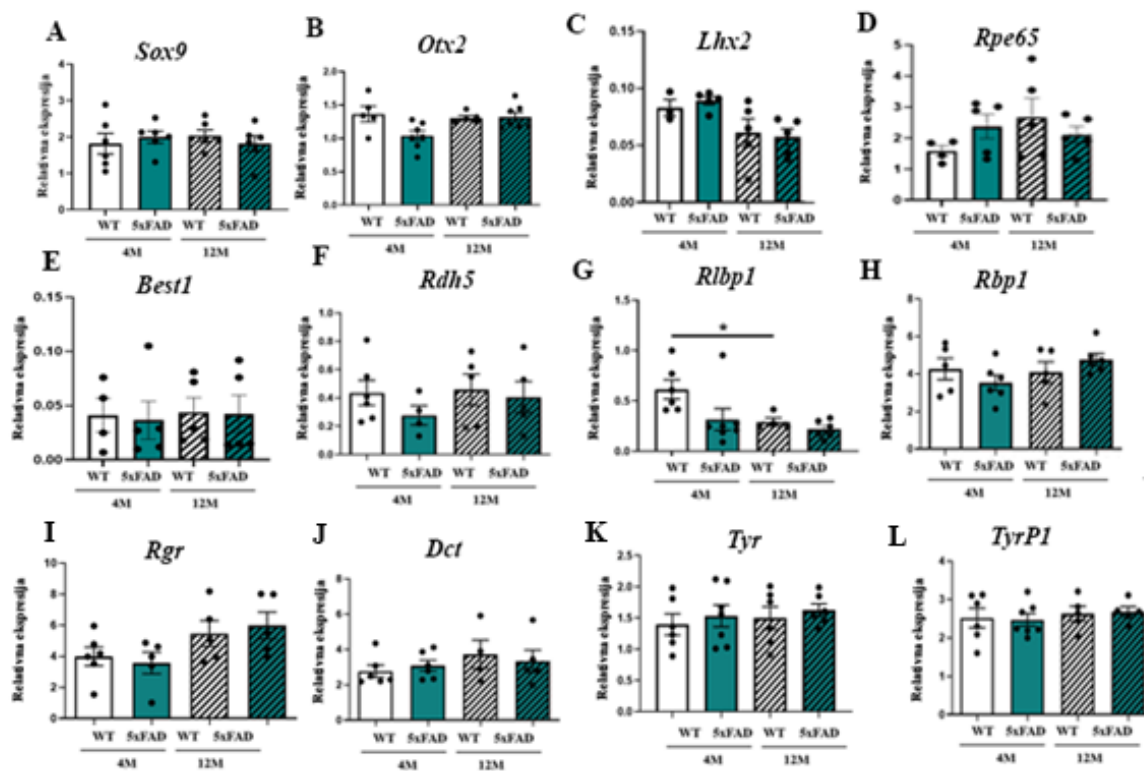


**Slika 14.** Analiza ekspresije gena uključenih u regulaciju sinteze i transporta holesterola tokom starenja. qRT-PCR analiza ekspresije gena (A) *Lxrβ*, (B) *Hmgcr*, (D) *Abca1* i (F) *ApoE* u MPE-u kod 4M i 12M WT i 5XFAD mrežnjača (n=5). Ispitivane su grupe od 4 i 12 M starih WT i 5XFAD MPE. Western blot analiza zastupljenosti (C) HMGCR i (E) ABCA1 proteina u MPE-u (n=5). Prikazani su reprezentativni imunoblotovi. Statistička obrada rezultata je urađena pomoću dvosmerne ANOVA. Podaci su predstavljeni kao srednja vrednost ± SEM. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ .

#### 4.1.8. Ekspresija gena vizuelnog ciklusa u MPE-u tokom starenja

Holesterol je neophodan za pravilno odvijanje vizuelnog ciklusa retinala koji se obavlja u MPE-u i neophodan je za pravilan vid. Ispitano je kakav uticaj imaju fiziološko i patološko starenje na ekspresiju gena vizuelnog ciklusa u MPE-u (Slika 15). Urađena je qRT-PCR analiza ekspresije gena vizuelnog ciklusa u MPE-u ispitivanim eksperimentalnim grupama (4M WT, 4M 5XFAD, 12M WT, 12M 5XFAD). Od svih ispitivanih gena jedine promene su primećene samo kod ekspresije *Rlbp1* gena. Značajne promene su primećene u ekspresiji proteina nosača retinoida – *Rlbp1*. Zabeležen je značajan pad u ekspresiji *Rlbp1* gena kod 12M WT starih MPE u odnosu na 4M stare kontrole. Dvosmerna ANOVA pokazuje da samo faktor starosti ima značajan uticaj ( $F_{\text{starost}} = 6,931$ ;  $p = 0,0181$ ), dok faktor genotipa kao ni interakcija faktora nisu imali značajan uticaj (Slika 15 G). Analiza ekspresije ostalih gena vizuelnog ciklusa (*Sox9*, *Otx2*, *Lxh2*, *Rpe65*, *Best1*, *Rdh5*, *Rbp1*, *Rgr*, *Dct*, *Tyr i TyrP1*) nije pokazala značajne promene u njihovoj ekspresiji (Slika 15 A-F).





**Slika 15.** qRT-PCR analiza ekspresije gena uključenih u regulaciju vizuelnog ciklusa u MPE-u kod 4 i 12 M starih WT i 5XFAD miševa. Ekspresija gena vizuelnog ciklusa (A) *Sox9*, (B) *Otx2*, (C) *Lhx2*, (D) *RPE65I*, (E) *Best1*, (F) *Rdh5*, (G) *Rlbp1*, (H) *Rbp1*, (I) *Rgr*, (J) *Dct*, (K) *Tyr*, (L) *TyrP1*. n=5. Ispitivane su grupe od 4M i 12 M starih WT i 5XFAD MPE. Statistička obrada rezultata je urađena pomoću dvosmerne ANOVA. Podaci su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$ SEM. \* p < 0,05.

## 4.2. REZULTATI II DEO

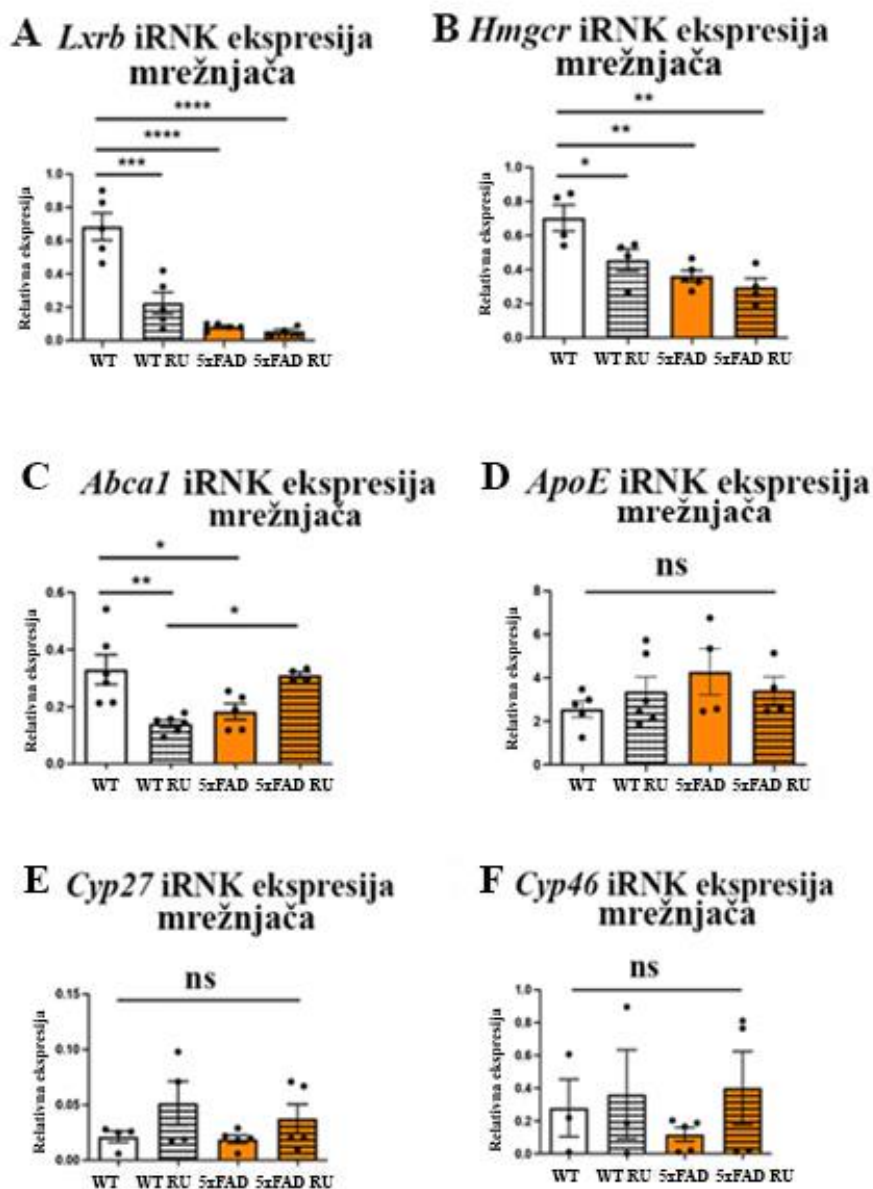
### 4.2.1. Promene u mrežnjači tokom tretmana ribljim uljem

U ovom delu eksprimenata je ispitivan uticaj tretmana RU-em na promene ekspresije gena uključenih u metabolizam holesterola, kao i na transcitozu i glimfatički sistem u presimptomatskoj fazi AB.

Pravilna homeostaza DHK je neophodna za normalno funkcionisanje mrežnjače (Lafuente i sar., 2021). RU predstavlja bogat izvor nezasićenih masnih kiselina i suplementacija RU-em je široko rasprostranjena (Chouinard-Watkins i Basinet, 2018). Sve se više preporučuju visoke doze RU-a pacijentima koji boluju od AB (Liu i sar., 2022).

### 4.2.2. Efekat tretmana ribljim uljem na ekspresiju gena koji regulišu metabolizam holesterola u mrežnjači

Kako je poznato da suplementacija RU-em snižava nivo holesterola (Zhang 2023), analizirali smo da li tretman RU-em utiče na ekspresione nivoe gena koji regulišu sintezu, transport i eliminaciju holesterola u mrežnjači 4 M starih WT i 5XFAD miševa. Ispitano je kako tretman RU-em deluje na ekspresiju *Lxrβ* i *Hmgcr*, ključnih gena koji učestvuju u regulaciji sinteze holesterola, u mrežnjači svih eksperimentalnih grupa. Analiza ekspresije *Lxrβ* u mrežnjači je pokazala da je tretman RU-em doveo do smanjene ekspresije kod WT u odnosu na netretiranu WT grupu (3,03 puta), dok kod 5XFAD mrežnjača tretman nije imao značajnog efekta (Slika 16 A). Analiza ovih rezultata dvosmernom ANOVA je pokazala da je tretman RU-em imao najveći uticaj ( $F_{\text{tretman}} = 48,41$ ;  $p < 0,0001$ ), zatim faktor genotipa ( $F_{\text{genotip}} = 19,18$ ;  $p = 0,0006$ ), dok je interakcija faktora imala najmanji uticaj ( $F_{\text{tretman} \times \text{genotip}} = 15,12$ ;  $p = 0,0015$ ). Pod tretmanom RU-em ekspresija *Hmgcr* je smanjena u mrežnjačama WT RU u odnosu na netretirane kontrole WT (0,32 puta), dok kod 5XFAD tretman nije imao efekta na dalje smanjenje već niskih nivoa ekspresije *Hmgcr* u mrežnjači (Slika 16 B). Analiza dvosmernom ANOVA je pokazala da je najveći uticaj na ekspresiju *Hmgcr* gena imao tretman ( $F_{\text{tretman}} = 30$ ;  $p = 0,0072$ ), zatim faktor genotipa ( $F_{\text{genotip}} = 15,35$ ;  $p = 0,0414$ ), dok interakcija ova dva faktora nije imala značajnog uticaja na ekspresiju *Hmgcr*. Ispitivane promene u ekspresiji gena koji su uključeni u regulaciju transporta holesterola, *ApoE*, u mrežnjači miševa divljeg soja i 5XFAD miševa (Slika 16 C, D) su pokazale da tretman RU povećava ekspresiju *ApoE* gena u 5XFAD mrežnjačama do nivoa izmerenog u netretiranim kontrolama divljeg soja. Međutim, tretman RU-em kod divljeg soja je imao suprotan efekat i doveo je do smanjenja ekspresije *ApoE* u odnosu na kontrolne životinje (2,37 puta) (Slika 16 C). Analiza dvosmernom ANOVA je pokazala da je na ekspresiju *ApoE* u mrežnjači značajan uticaj imala interakcija faktora ( $F_{\text{tretman} \times \text{genotip}} = 52,67$ ,  $p = 0,0007$ ), dok faktori tretmana i genotipa, pojedinačno, nisu imali uticaja. Analiza ekspresije *ApoE* transportera dvosmernom ANOVA nije pokazala nikakve razlike nakon tretmana RU u mrežnjači ni kod WT ni kod 5XFAD miševa (Slika 16 D). Ključni geni koji su zaduženi za eliminaciju holesterola iz mrežnjače su *Cyp27* i *Cyp46*. Dvosmernom ANOVA nije pokazala značajan uticaj tretmana, genotipa, kao ni interakcije faktora na ekspresiju *Cyp27* i *Cyp46* u mrežnjači (Slika 16 E, F).



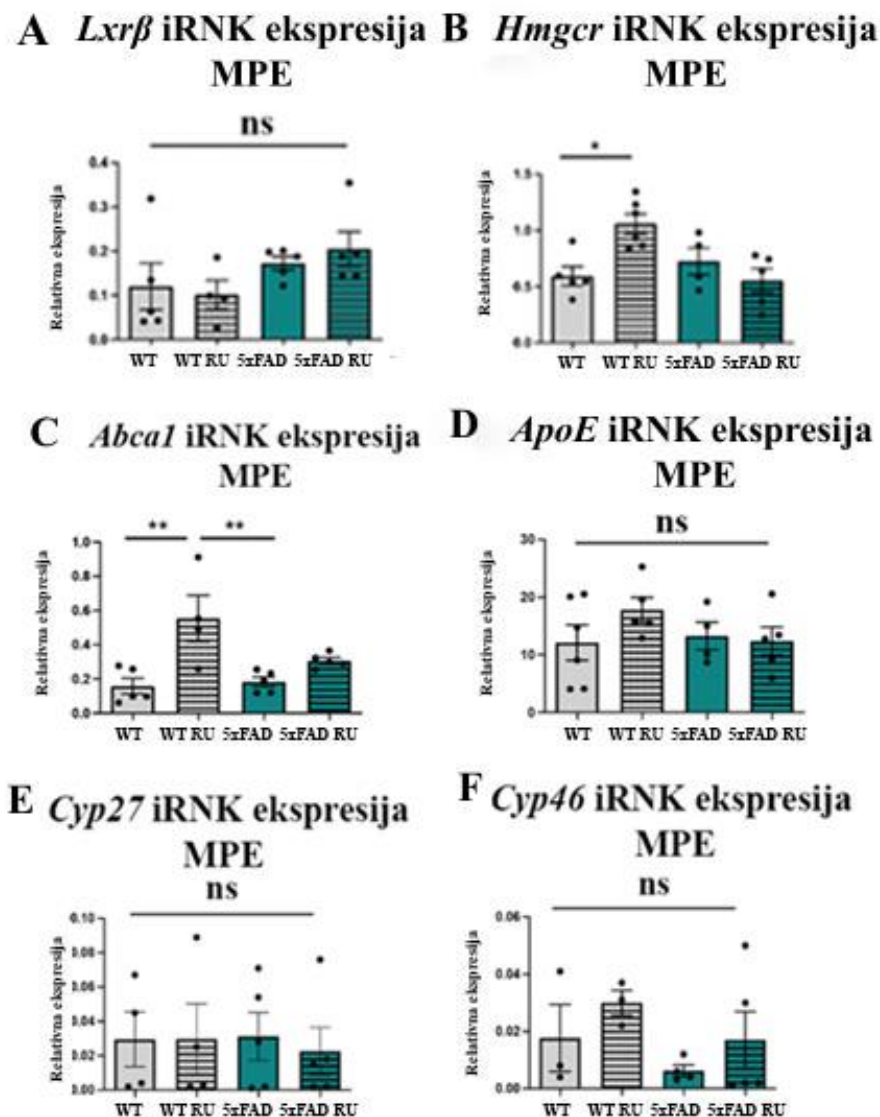
**Slika 16.** Analiza ekspresije gena uključenih u regulaciju sinteze, transporta i eliminacije holesterola u mrežnjači pod tretmanom RU-em. Ekspresioni nivoi gena koji regulišu sintezu, transport i eliminaciju holesterola u (A) *Lxrβ* i (B) *Hmgcr*, (C) *Abca1*, (D) *ApoE*, (E) *Cyp27*, (F) *Cyp46* gena u mrežnjači pod tretmanom RU-em određena pomoću lančane polimerazne reakcije u realnom vremenu (qRT-PCR) (n=5). Ispitivane su četiri grupe životinja - WT, 5XFAD, WT RU, 5XFAD RU. Statistička obrada rezultata je urađena pomoću dvosmerne ANOVA. Podaci su predstavljeni kao srednja vrednost ± SEM. \* p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001, \*\*\*\* p < 0,0001. ns – nema statističke značajnosti.

#### 4.2.3. Efekat tretmana ribljim uljem na ekspresiju gena koji regulišu metabolizam holesterola u MPE-u

Tretman RU-em nije doveo do promena nivoa ekspresije *Lxrβ* u MPE-u (Slika 17 A). Statistička analiza rezultata pomoću dvosmerne ANOVA nije pokazala značajan uticaj tretmana, genotipa i interakcije ovih faktora na ekspresiju *Lxrβ* u MPE-u. U MPE-u je tretman RU-em doveo do povećanja ekspresije *Hmgcr* iRNK kod divljeg soja, ali nije uticao na nivo ekspresije ovog gena kod 5XFAD miševa (Slika 17 B). Analiza rezultata

dvosmernom ANOVA nije pokazala značajan uticaj tretmana, ni genotipa, dok je interakcija faktora pokazala statistički značajan uticaj ( $F_{\text{tretman} \times \text{genotip}} = 30,29$ ;  $p = 0,0091$ ). Analiza promena ekspresije *Abca1* u MPE-u je pokazala da *Abca1* iRNK raste pod tretmanom kod divljeg soja ali ne kod 5XFAD miševa (Slika 17 C). Analiza promena nivoa ekspresije *Abca1* u MPE-u dvosmernom ANOVA je pokazala značajan uticaj genotipa ( $F_{\text{genotip}} = 34,06$ ;  $p = 0,0064$ ), dok faktor tretmana, kao ni interakcija faktora nisu imali značajnog uticaja. Analiza ekspresije *ApoE* transportera u MPE-u nije pokazala nikakve promene nakon tretmana RU-em ni kod WT ni kod 5XFAD miševa (Slika 17 D). Analiza ekspresije ključnih gena zaduženih za eliminaciju holesterola pokazala je da u MPE-u nema nikakve razlike ni kod divljeg soja ni kod 5XFAD miševa nakon tretmana RU-em za *Cyp27* (Slika 17 E) dok promene ekspresije *Cyp46* nisu bile statistički značajne (Slika 17 E, F).

Iz svega navedenog možemo videti da tretman RU-em nije imao značajan uticaj na metabolizam holesterola u MPE-u, za razliku od mrežnjače gde su efekti tretmana bili izraženiji, najverovatnije zbog nezavisnosti MPE-a u odnosu na okolne strukture (Lewandowski i sar., 2022).



**Slika 17.** Analiza ekspresije gena uključenih u regulaciju sinteze, transporta i eliminacije holesterola u MPE-u kod WT i 5XFAD miševa pod tretmanom RU-em. qRT-PCR analiza ekspresije (A) *Lxrβ*, (B) *Hmgcr*, (C)

*Abca1*, (D) *ApoE*, (E) *Cyp27* i (F) *Cyp46* (n=5). Ispitivane su četiri grupe životinja - WT, 5XFAD, WT RU, 5XFAD RU. Statistička obrada rezultata je urađena pomoću dvosmerne ANOVA. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost ± SEM. \* p < 0,05, \*\* p < 0,01, ns – nema statističke značajnosti.

#### 4.2.4. Efekti tretmana visokim dozama ribljim uljem na transportere DHK i gene vizuelnog ciklusa u MPE-u

##### 4.2.4.1. Ekspresija DHK transportera u MPE-u pod tretmanom ribljim uljem

Pokazano je da se transporteri DHK, ADIPOR1 i MFSD2A eksprimiraju u MPE-u. Ablacija *AdipoR1* dovodi do poremećenog vizuelnog ciklusa retinola, jer njegovo odsustvo onemogućava konverziju 11-cis retinalola u 11-cis retinal, što je neophodno za normalan proces vida (Bazan, 2015). MFSD2A je takođe neophodan za normalno funkcionisanje MPE-a (Wong i sar., 2016) Zbog toga smo ispitali da li tretman RU, koje sadrži veliki procenat DHK, utiče na ekspresiju transportera DHK, *AdipoR1* i *Mfsd2a*.

Analiza ekspresije *AdipoR1* u MPE-u je pokazala značajan porast ekspresije kod 5XFAD u odnosu na ekspresiju u MPE-u kontrolnih miševa (Slika 18A – u narednom poglavlju). Tretman RU-em nije imao nikakav efekat na ekspresiju *AdipoR1* u MPE-u ni kod WT ni kod 5XFAD miševa. Dvosmerna ANOVA je pokazala da samo faktor genotipa ima značajan uticaj na ekspresione nivoe *AdipoR1* ( $F_{\text{genotip}} = 67,95$ ;  $p < 0,0001$ ).

Kako je *Mfsd2a* takođe uključen u preuzimanje DHK u MPE-u ispitali smo kako tretman RU-em utiče na ekspresiju *Mfsd2a* u ovom tkivu. Analiza ekspresije *Mfsd2a* je pokazala da nema značajnih razlika između 5XFAD i kontrola divljeg soja. Pod tretmanom RU dolazi do značajnog povećanja ekspresije *Mfsd2a* kod divljeg soja u odnosu na njihove netretirane kontrole, dok tretman RU-em nema efekat kod 5XFAD MPE (Slika 18 B – u narednom poglavlju). Dvosmerna ANOVA pokazuje da najveći uticaj ima faktor tretmana ( $F_{\text{genotip}} = 28,19$ ,  $p = 0,0014$ ), zatim interakcija faktora tretmana i genotipa ( $F_{\text{tretman} \times \text{genotip}} = 26,50$ ;  $p = 0,0017$ ), i na kraju faktor genotipa ( $F_{\text{genotip}} = 26,34$ ;  $p = 0,0018$ ).

Kako je *Srebp1-c* jedan od predloženih regulatora MFSD2A ekspresije, ispitana je njegoa ekspresija u MPE-u kod sve četiri eksperimentalne grupe. Analiza ekspresije *Srebp1-c* je pokazala da ne dolazi do promena u MPE-u ni u jednoj od ispitivanih grupa. Dvosmerna ANOVA nije pokazala značajan uticaj faktora tretmana, genotipa, kao ni interakcije ovih faktora (Slika 18 C – u narednom poglavlju), što znači da neki drugi mehanizam dovodi do povećanja ekspresije *Mfsd2a* pod tretmanom RU-em.

##### 4.2.4.2. Promene ekspresije gena vizuelnog ciklusa retinala u MPE-u pod tretmanom ribljim uljem

Analiza transkripcionih faktora uključenih u regulaciju vizuelnog ciklusa je pokazala da je ekspresija ovih gena u MPE-u promenjena pod tretmanom samo kod divljeg soja dok je kod 5XFAD ostala nepromenjena (Slika 18 D, E, G). Tretman RU-em je značajno smanjio ekspresiju *Sox9* iRNK (4,89 puta) u MPE-a kod kontrola divljeg soja, dok kod 5XFAD miševa tretman nije imao nikakav efekat. Analiza rezultata dvosmernom ANOVA je pokazala da je najveći uticaj imao faktor tretmana RU-em ( $F_{\text{tretman}} = 24,82$ ;  $p = 0,0145$ ), zatim faktor genotipa ( $F_{\text{genotip}} = 20,46$ ;  $p = 0,0240$ ), dok interakcija faktora nije imala značajnog uticaja (Slika 18 D). Kod MPE divljeg soja tretiranih RU je došlo do smanjenja ekspresije *Otx2* u odnosu na netretirane kontrole (7,57 puta), dok kod 5XFAD nije bilo značajnih razlika. Dvosmerna ANOVA je pokazala da je najveći uticaj imao faktor genotipa ( $F_{\text{genotip}} = 23,66$ ;  $p = 0,0042$ ), zatim interakcija faktora tretmana i genotipa ( $F_{\text{tretman} \times \text{genotip}} =$

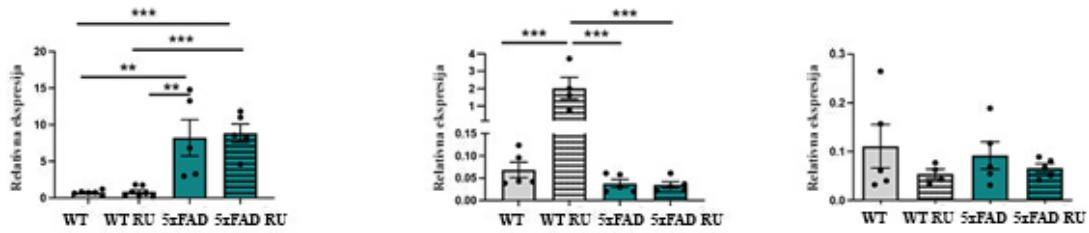
20,61;  $p = 0,0069$ ), dok faktor tretmana nije pokazao značaja uticaj (Slika 18 E). Ekspresioni nivoi *Lhx2* nisu bili promenjeni ni u jednoj od ispitivanih grupa (Slika 18 G).

Analizirana je i ekspresija glavnih MPE-specifičnih komponenti vizuelnog ciklusa (*Rpe65*, *Rdh5*) (Slika 18 F,H). Ekspresija *Rpe65* iRNK nije promenjena pod tretmanom RU ni u jednoj od analiziranih eksperimentalnih grupa. Analiza ekspresije *Rdh5* gena je pokazala njegovu smanjenu ekspresiju kod divljeg soja pod tretmanom (2,44 puta), dok kod 5XFAD RU nije dovelo do značajnih promena. Dvosmerna ANOVA je pokazala da najveći uticaj ima faktor genotipa ( $F_{\text{genotip}} = 15,76$ ;  $p = 0,0451$ ), dok ni faktor tretmana ni interakcija faktora nisu imali značajnog uticaja.

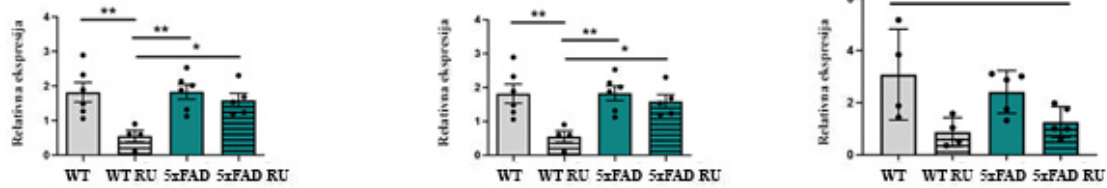
Analizirana je i ekspresija dva nosača retinoidnih proteina (*Rbp1*, *Rlbp*, Slika 18 N, O), i modulator procesa sinteze u vizuelnom ciklusu (*Rgr*, Slika 18 I) pošto nosač katalizuje ograničavajući korak sinteze u vizuelnom ciklusu. Dodatno smo analizirali zastupljenost gena regulatora ekspresije vizuelnog pigmenta (*Dct*, *Tyr* i *TyrP1*) (Slika 18 K-M). Jedino je ekspresija *Tyr* bila povećana pod tretmanom RU kod životinja divljeg soja (12,23 puta) dok je kod 5XFAD miševa ostala nepromenjena (Slika 18 L). Dvosmerna ANOVA pokazuje da je najveći uticaj imao faktor genotipa ( $F_{\text{genotip}} = 22,42$ ;  $p = 0,0018$ ), pa interakcija faktora tretmana i genotipa ( $F_{\text{tretman} \times \text{genotip}} = 18,48$ ;  $p = 0,004$ ) i faktor tretmana ( $F_{\text{tretman}} = 18$ ;  $p = 0,0043$ ).

Na ekspresione nivoe *Rgr*, *Best1*, *Rbp1* i *Rlbp1* (Slika 18 I, J, N, O) gena u MPE-u ni tretman RU-em ni genotip nisu imali uticaja.

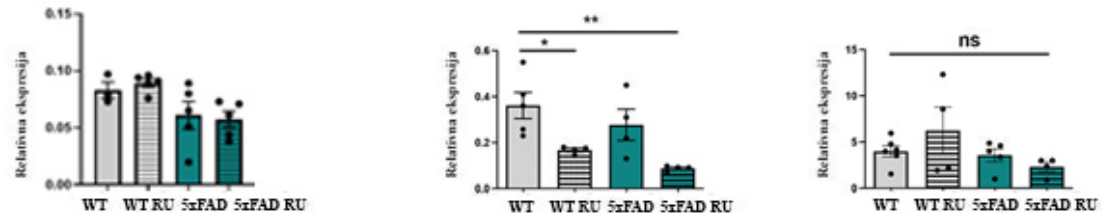
**A** *AdipoR1* iRNK ekspresija    **B** *Mfsd2a* iRNK ekspresija    **C** *Srebp1-c* iRNK ekspresija



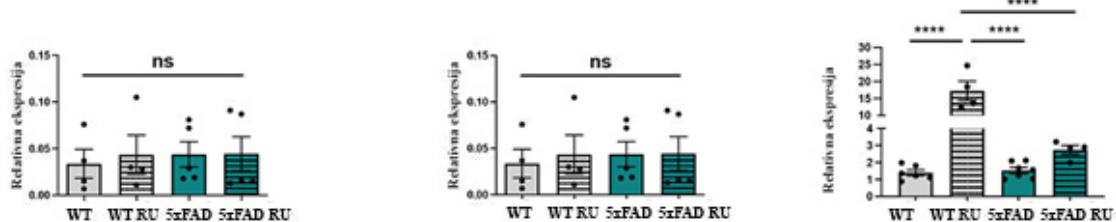
**D** *Sox9* iRNK ekspresija    **E** *Otx2* iRNK ekspresija    **F** *RPE65* iRNK ekspresija



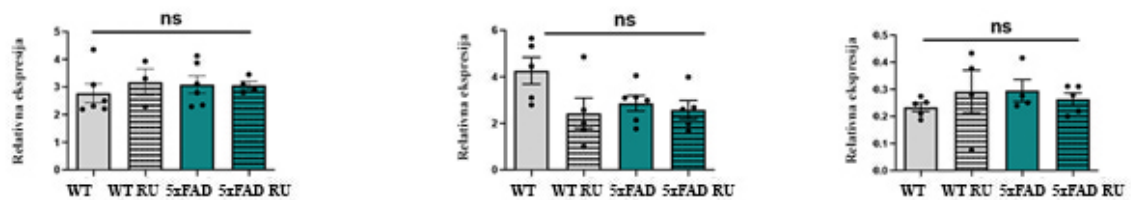
**G** *Lhx2* iRNK ekspresija    **H** *Rdh* iRNK ekspresija    **I** *Rgr* iRNK ekspresija



**J** *Best1* iRNK ekspresija    **K** *Dct* iRNK ekspresija    **L** *Tyr* iRNK ekspresija



**M** *Tyrp1* iRNK ekspresija    **N** *Rbp1* iRNK ekspresija    **O** *Rlbp1* iRNK ekspresija



**Slika 18.** qRT-PCR analiza ekspresije gena koji regulišu transport DHK i ekspresije gena uključenih u regulaciju vizuelnog ciklusa u MPE-u kod netretiranih i RU-em tretiranih WT i 5XFAD miševa. Ekspresija gena koji regulišu transport DHK (A) *AdipoR1*, (B) *Mfsd2a*, (C) *Srebp1-c*. Ekspresija gena vizuelnog ciklusa (D) *Sox9*, (E) *Otx2*, (F) *RPE65*, (G) *Lhx2*, (H) *Rdh*, (I) *Rgr*, (J) *Best1*, (K) *Dct*, (L) *Tyr*, (M) *TyrP1*, (N) *Rbp1*, (O) *Rlbp1*. n=5. Ispitivane su četiri grupe životinja - WT, 5XFAD, WT RU, 5XFAD RU. Podaci dobijeni analizom pomoću dvosmerne ANOVA su predstavljeni kao srednja vrednost ± SEM. \* p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\*\* p < 0,0001. ns – nema statističke značajnosti.

#### 4.2.5. Tretman ribljim uljem menja ekspresiju *Mfsd2a* iRNK i MFSD2A proteina u mrežnjačama divljeg soja i 5XFAD miševa

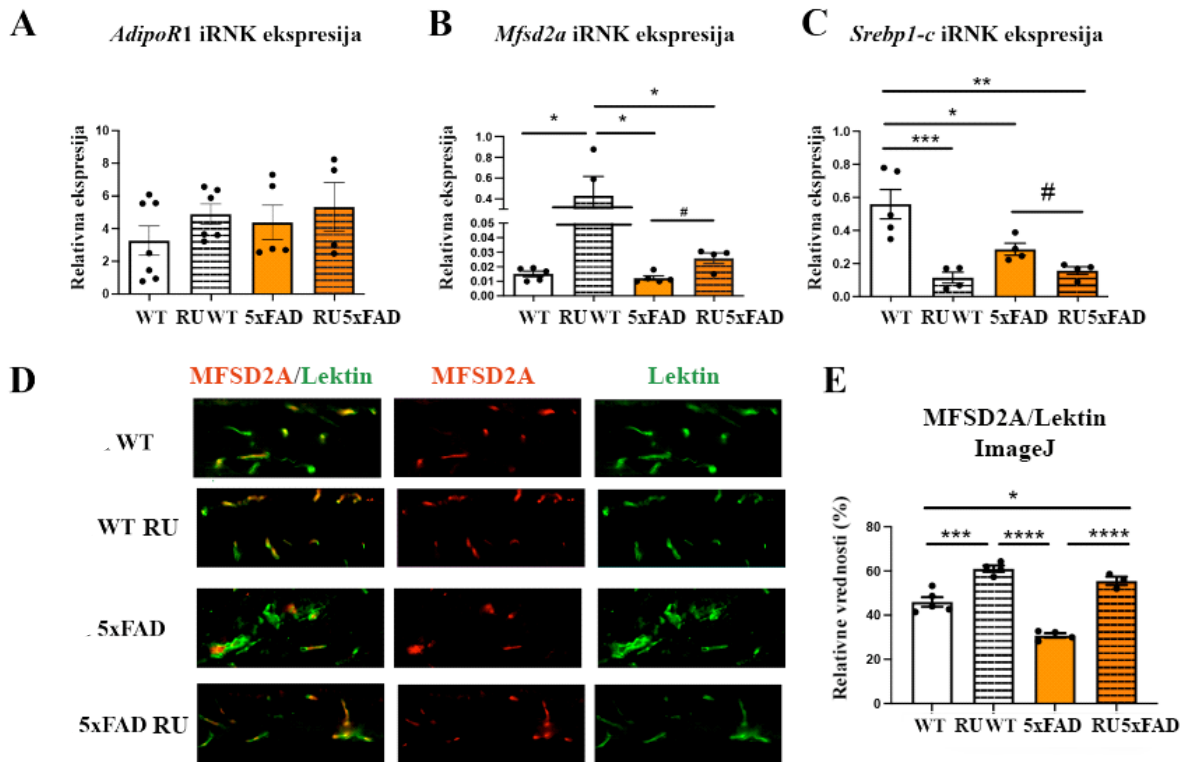
Zbog značaja DHK za pravilno funkcionisanje mrežnjače bilo je potrebno ispitati da li se nivoi ekspresije njenih transportera, *AdipoR1* i *Mfsd2a*, menjaju pod tretmanom RU-em.

Pokazano je da se ekspresija *AdipoR1* transportera DHK u mrežnjači ne menja ni u zavisnosti od genotipa ni pod tretmanom RU-em (Slika 19 A). Nivo ekspresije *Mfsd2a* raste pod tretmanom RU-em kod WT mrežnjača (16,6 puta), dok se kod 5XFAD mrežnjača ekspresija pod tretmanom RU-em ne menja. Statistička analiza pomoću dvosmerne ANOVA pokazuje da interakcija faktora tretmana i genotipa ima najveći uticaj ( $F_{\text{tretman} \times \text{genotip}} = 32,08$ ;  $p = 0,0046$ ), zatim faktor tretmana ( $F_{\text{tretman}} = 20,27$ ;  $p = 0,0184$ ), dok faktor genotipa nije imao značajnog uticaja. Treba napomenuti da je analiza *Mfsd2a* ekspresije putem Man-Whitney neparametrijskog poređenja pokazala statistički značajno povećanje kod tretiranih u odnosu na netretirane 5XFAD mrežnjače.

Jedan od predloženih regulatora *Mfsd2a* ekspresije je *Srebp1-c* (Slika 19 B). Nivo ekspresije *Srebp1-c* je smanjen kod 5XFAD mrežnjača u odnosu na kontrole divljeg soja (Slika 19 C). Pod tretmanom RU dolazi i do smanjenja ekspresije kod tretiranih WT mrežnjača u odnosu na njihove kontrole divljeg soja. Kod 5XFAD je tretman RU doveo do smanjenja nivoa ekspresije *Srebp1-c* u odnosu na kontrole divljeg soja (1,62 puta), ali ne i u odnosu na 5XFAD kontrole, već samo pokazuje trend smanjenja bez statističke značajnosti. Dvosmerna ANOVA je pokazala da faktor genotipa ima najveći uticaj ( $F_{\text{genotip}} = 51,25$ ;  $p = 0,0023$ ), dok tretman RU, kao ni interakcija tretmana i genotipa nisu imali značajnog uticaja na ekspresiju *Srebp1-c*. Treba napomenuti da je analiza *Srebp1-c* ekspresije putem Man-Whitney neparametrijskog poređenja pokazala statistički značajno smanjenje kod tretiranih u odnosu na netretirane 5XFAD mrežnjače.

Glavno mesto ekspresije *Mfsd2a* u mrežnjači je u endotelnim ćelijama krvnih sudova mrežnjače (Lobanova i sar., 2019) (Slika 19 D). S obzirom na primećeno povećanje ekspresije *Mfsd2a* u mrežnjači ispitali smo ekspresiju MFSD2A proteina specifično na krvnim sudovima u svim eksperimentalnim grupama. Korišćeno je anti-MFSD2A antitelo (crveno) i lektin (zeleno) koji služi za obeležavanje krvnih sudova jer se specifično vezuje za endotelne ćelije. ImageJ analiza imunohistohemijskog bojenja je pokazala da tretman RU-em dovodi do značajnog povećanja prekrivenosti krvnih sudova sa MFSD2A i kod mrežnjača divljeg soja i kod 5XFAD miševa. Analiza dvosmernom ANOVA je pokazala da najveći uticaj ima faktor tretmana ( $F_{\text{tretman}} = 69,25$ ;  $p < 0,0001$ ), zatim faktor genotipa ( $F_{\text{genotip}} = 18,86$ ;  $p = 0,0185$ ), i na kraju interakcija faktora ( $F_{\text{starost} \times \text{genotip}} = 4,090$ ;  $p = 0,0217$ ).





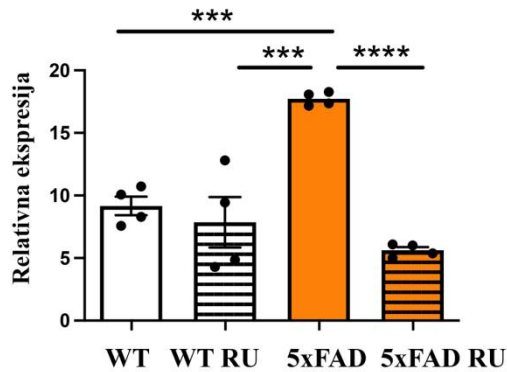
**Slika 19.** Analiza ekspresije DHK transportera i perivaskularne zastupljenosti MFSD2A u mrežnjačama WT i 5XFAD miševa pod tretmanom RU-em. qRT-PCR analiza ekspresije gena koji regulišu DHK transport: (A) *AdipoR1*, (B) *Mfsd2a* i (C) *Srebp1-c* u mrežnjači WT i 5XFAD netretiranih i RU-em tretiranih miševa (n=5) (D) Imunohistohemijska analiza perivaskularne zastupljenosti MFSD2A u mrežnjači (MFSD2A – crveno, Lektin – zeleno) (E) Image J kvantifikacija vaskularne zastupljenosti MFSD2A. Rezultati su predstavljani kao odnos vrednosti izmerenih za AQP4 i lektin zastupljenost i izraženi u procentima (grafik). Ispitivane su četiri grupe životinja - WT, 5XFAD, WT RU, 5XFAD RU. Analiza rezultata je urađena dvosmernom ANOVA (n=4). Skala – 50  $\mu$ m. Podaci su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  SEM. \* p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001, \*\*\*\* p < 0.0001.

#### 4.2.6. Tretman ribljim uljem menja zastupljenost AQP4 u mrežnjačama divljeg soja i 5XFAD miševa

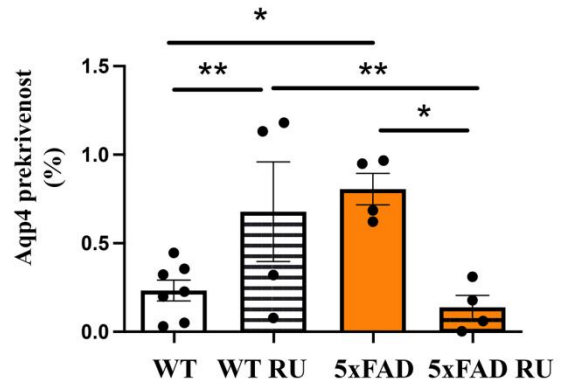
Ispitivana je ekspresija iRNK (Slika 20 A) i proteina (Slika 20 B, C) akvaporina 4 u mrežnjačama kontrolnih i RU-em tretiranih miševa divljeg soja i 5XFAD. Dobijeni rezultati pokazuju da je ekspresija *Aqp4* iRNK značajno veća u mrežnjačama 5XFAD miševa u poređenju sa kontrolnim životinjama divljeg soja (3,47 puta). Tretman RU-em je doveo do povećanja ekspresije *Aqp4* iRNK u mrežnjačama divljeg soja (3,04 puta) u odnosu na netretirane miševe divljeg soja. Nasuprot tome, kod 5XFAD mrežnjača je zabeležen pad ekspresije *Aqp4* (4,1 puta) u odnosu na netretirane 5XFAD miševe. Dvosmerna ANOVA je pokazala da ni faktor tretmana, ni faktor genotipa nisu imali značajnog uticaja, dok je značajan uticaj pokazala interakcija faktora ( $F_{\text{tretman} \times \text{genotip}} = 54,63$ ; p = 0,0015). ImageJ analiza proteinske ekspresije AQP4 u mrežnjači je pokazala da je ona povećana kod 5XFAD miševa u odnosu na WT kontrole (Slika 20 B). Tretman RU-em je doveo do pada proteinske ekspresije AQP4 kod 5XFAD mrežnjača tretiranih RU u odnosu na netretirane 5XFAD kontrole (1,62 puta), dok tretman RU-em nije doveo do značajnih promena kod divljeg soja. Reprezentativne mikrofografije zastupljenosti AQP4 proteina u mrežnjačama kontrolnih i RU-em tretiranih WT i 5XFAD miševa su prikazane na slici 20 C. Analiza pomoću dvosmerne

ANOVA je pokazala da najveći uticaj ima faktor tretmana ( $F_{\text{tretman}} = 45,75$ ;  $p < 0,0001$ ), zatim interakcija faktora ( $F_{\text{tretman} \times \text{genotip}} = 29,58$ ;  $p = 0,0003$ ), i na kraju faktor genotipa ( $F_{\text{genotip}} = 10,16$ ;  $p = 0,0134$ ).

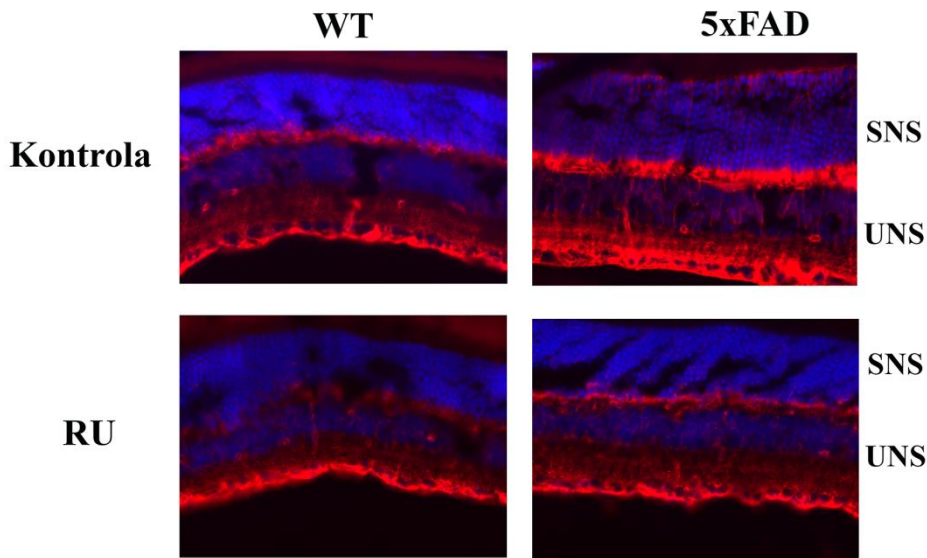
**A** *Aqp4* iRNK ekspresija



**B** Zastupljenost AQP4 (ImageJ)

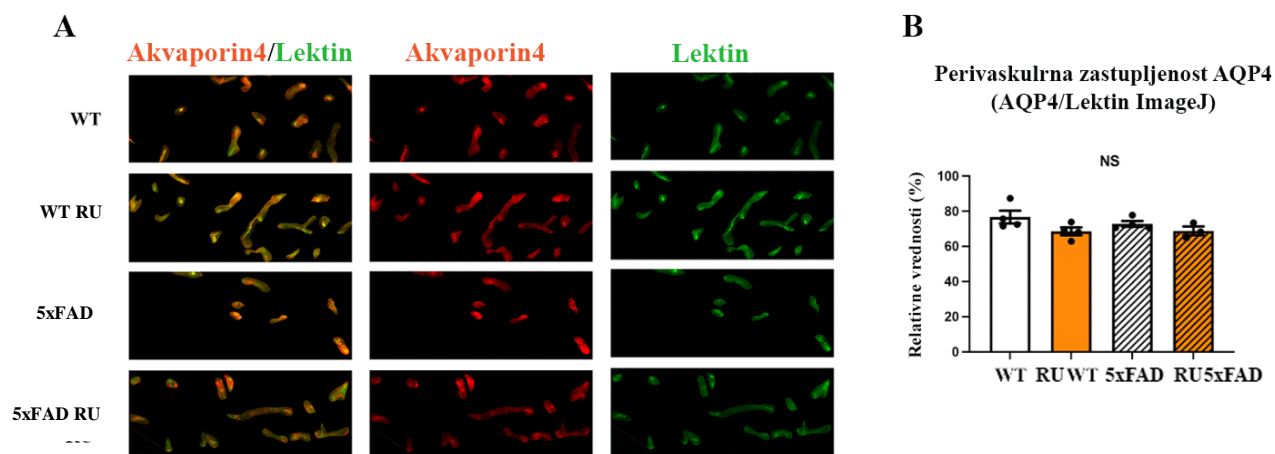


**C** Zastupljenost AQP4



**Slika 20.** Zastupljenost *Aqp4* iRNK i proteina u mrežnjači WT i 5XFAD netretiranih i RU-em tretiranih miševa (A) qRT-PCR analiza ekspresije *Aqp4* iRNK (B) Image J kvantifikacija AQP4 ekspresije. (C) Reprerativno imunobojenje AQP4 u mrežnjačama ispitivanih eksperimentalnih grupa. AQP4-crveno, DAPI-plavo. Analiza rezultata je urađena dvosmernom ANOVA ( $n=4$ ). Ispitivane su četiri grupe životinja - WT, 5XFAD, WT RU, 5XFAD RU. Skala – 50  $\mu\text{m}$ . Podaci su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  SEM. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

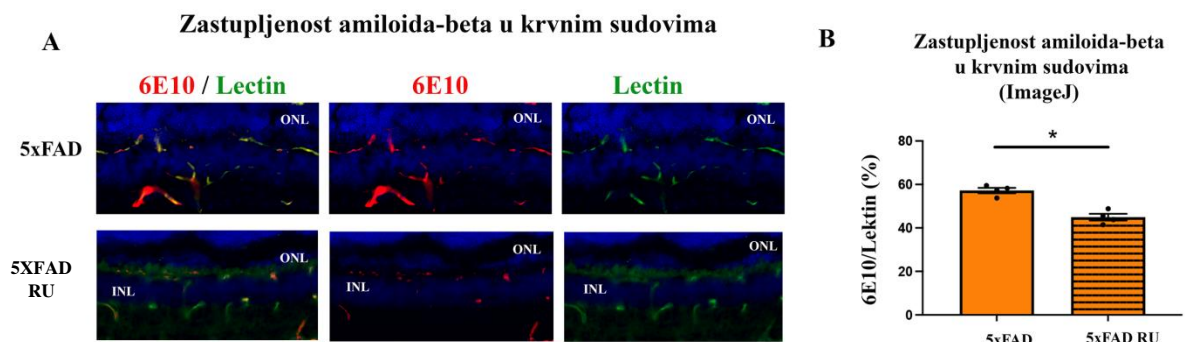
Poznato je da gliozna dovodi do poremećene perivaskularne polarizacije AQP4 koja može uticati na efikasnost funkcije glimfatičkog sistema u AB (Kress i sar., 2014). Promene u perivaskularnoj zastupljenosti AQP4 su značajno asocirane sa povećanim nagomilavanjem A $\beta$  (Zappenfield, 2017). Zbog toga je imunohistohemijskom analizom (Slika 21 A) ispitan efekat na perivaskularnu zastupljenost AQP4 proteina u mrežnjačama miševa divljeg soja i 5XFAD miševa. Obrada rezultata ImageJ analize dvosmernom ANOVA nije pokazala značajne razlike između ispitivanih grupa (Slika 21 B).



**Slika 21.** Analiza perivaskularne lokalizacije AQP4 u mrežnjači pod tretmanom RU-em. (A) Imunohistohemijska detekcija perivaskularne lokalizacije AQP4 u mrežnjači netretiranih i RU-em tretiranih WT i 5XFAD životinja (AQP4 – crveno, Lektin – zeleno). (B) Kvantifikacija je urađena u image J programu, a za statističku analizu je korišćena dvosmerna ANOVA. Rezultati su predstavljani kao odnos vrednosti izmerenih za AQP4 i lektin zastupljenost i izraženi u procentima. Četiri grupe životinja - WT, 5XFAD, WT RU, 5XFAD RU. Skala – 50  $\mu$ m. Statistička analiza je urađena pomoću dvosmerne ANOVA (grafik) (n=4). Podaci su predstavljani kao srednja vrednost  $\pm$  SEM.

#### 4.2.7. Ekspresija amiloida $\beta$ u mrežnjači pod tretmanom riblim uljem kod 5XFAD

Pokazane promene u ekspresiji MFSD2A i AQP4 u mrežnjači 5XFAD miševa nakon tretmana RU-em ukazuje na njegovu protektivnu ulogu u regulaciji propustljivosti KMrB. Zato smo ispitali kako tretman RU-em utiče na akumulaciju A $\beta$  u krvnim sudovima. Imunohistohemijsko bojenje anti-6E10 antitelom (crveno) koje boji A $\beta$  kao i lektinom (zeleno) koji obeležava endotelne ćelije krvnih sudova (Slika 22 A) su korišćeni za analizu promena u nakupljanju A $\beta$  u krvnim sudovima u mrežnjači 5XFAD RU-em tretiranih i netretiranih miševa. Kvantifikacija ekspresije 6E10 proteina u krvnim sudovima je rađena u ImageJ programu, a za statističku analizu podataka je korišćen neparametrijski t test. Pokazan je statistički značajan pad ekspresije 6E10 u mrežnjačama tretiranim sa RU-em (21%) (Slika 22 B).



**Slika 22.** Promena zastupljenosti A $\beta$  u krvnim sudovima mrežnjače kod RU-em tretiranih 5XFAD miševa. (A) Imunohistohemijska analiza zastupljenosti A $\beta$  (anti-6E10 – crveno) u krvnim sudovima (lektin – zeleno) mrežnjače netretiranih i RU-em tretiranih 5XFAD miševa (DAPI – plavo) (B) Image J kvantifikacija vaskularne zastupljenosti 6E10. Rezultati su predstavljeni kao odnos vrednosti izmerenih za zastupljenost 6E10 i lektina i izraženih u procentima. Dve grupe životinja - 5XFAD, 5XFAD RU. Statistička analiza podataka je urađena neparametrijskim t testom (n=4). Skala – 50  $\mu$ m. Podaci su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  SEM. \* p < 0,05.

## 5. DISKUSIJA

Patološke karakteristike AB su otkrivene u mrežnjači, jedinom spolja dostupnom delu CNS-a. Međutim, tačan prostorni i vremenski raspored pojava ovih patoloških promena u ranim fazama bolesti kao i njihove promene tokom napredovanja bolesti još uvek nisu do kraja razjašnjene. S obzirom da je starenje jedan od najvažnijih faktora rizika za razvoj AB, bolje poznavanje promena u mrežnjači vezanih za starenje imaju izuzetno važan dijagnostički potencijal. Studija Koronyo i saradnika (2023) je detaljno analizirala podložnost mrežnjače za razvoj AB patologije uključujući molekularne, ćelijske i strukturne promene koje mogu da se identifikuju u najranijim fazama bolesti. Takođe je identifikovana i mapirana retinopatija kod AB pacijenata. Štaviše, pokazana je merljiva povezanost između napredovanja patoloških procesa u mrežnjači s jedne strane i napredovanja patologije u mozgu i promenama u kogniciji sa druge (Koronyo i sar., 2023). Postoje naznake da bi mrežnjača mogla da se rutinski koristi za neinvazivne preventivne preglede starije populacije kao i za praćenje razvoja AB kod obolelih pacijenata.

Naša istraživanja su imala za cilj da ukažu na specifične promene koje se dešavaju u mrežnjači 5XFAD životinjskog modela AB u toku fiziološkog i patološkog starenja. Pored toga, evaluirali smo i terapijski efekat kratkotrajnog tretmana visokim dozama ribljeg ulja u presimptomatskoj fazi bolesti. U ovoj studiji smo se bavili ispitivanjem promena u mrežnjačama ženki 5XFAD animalnog modela AB tokom starenja sa posebnim fokusom na promene u ekspresiji ključnih gena odgovornih za regulaciju holesterolskog metabolizma u mrežnjači i MPE-u, kao i nakon tretmana RU-em. Takođe smo ispitivali promene na krvnim sudovima nastalim kao posledica nagomilavanja A $\beta$  usled patološkog starenja kao i efektom tretmana RU-em na ovaj fenomen. Ispitivanja su rađena na ženkama zbog veće učestalosti/incidence obolevanja kod žena od AB (MD i sar., 2022), kao i jačeg odgovora na tretman. Tretman RU-em je rađen u presimptomatskoj fazi bolesti zbog pokazanog efekta na odlaganje početka ispoljavanja simptoma AB (Jović i sar., 2019).

Akumulacija A $\beta$  koja se javlja u mozgu obolelih od AB je primećena i u oku obolelih, što je dovelo do formiranja specifičnog izraza, „demencija oka”, ukazujući na povezanost patoloških simptoma između oka i mozga. Patologija povezana sa akumulacijom A $\beta$  narušava strukturni integritet KMrB u oku (Ratnayaka i sar., 2015) na isti način kao i kod KMB u mozgu, tako da postoji velika sličnosti u vaskulaturi mozga i mrežnjače pacijenata koji boluju od AB (Shi i sar., 2020).

5XFAD transgeni mišiji model AB karakteriše akumulacija A $\beta$  i formiranje plaka u mozgu (Oakley i sar., 2006). Međutim, za 5XFAD model je takođe karakteristično odsustvo amiloidnih plaka u mrežnjači za razliku od mozga gde su plake prisutne već od drugog meseca života jedinke, ali je 5XFAD idealan model za ispitivanje promena u krvnim sudovima mrežnjače (Perry i sar., 1984). Histoheмиjsko bojenje plaka pomoću ThS nije pokazalo formiranje značajnog broja plaka u mrežnjači tokom fiziološkog i patološkog starenja. Kao posledica nedostatka plaka neurodegenerativne promene u mrežnjači nisu izražene u tolikoj meri kao u mozgu. Osim povećane makroglioze u 12M 5XFAD miševima, koje su u saglasnosti sa prethodnim studijama rađenim u mozgu (de Pins i sar., 2019) i mrežnjači (Guo i sar., 2021), nismo primetili druge značajne promene. U našem istraživanju u mrežnjači nije primećena distrofija neurita (imunobojenje sa Smi31 antitelom), kao ni poremećaji u markerima sinaptičke plastičnosti (SPH) koji su karakteristični za fiziološko i patološko (AB) starenje mozga (Wong i sar., 2020). To znači da kod 5XFAD modela AB u mrežnjači ne

dolazi do morfološki vidljivih promena što je u skladu sa istraživanjima koja pokazuju da do ovih promena dolazi tek nakon 12 meseci starosti (Lim i sar., 2020).

S obzirom da glavne patološke promene u ispitivanim vremenskim tačkama nastaju u vaskulaturi 5XFAD mrežnjača, kao posledica nagomilavanja A $\beta$  u krvnim sudovima, identifikacija vaskularnih biomarkera mrežnjače bi mogla da unapredi znanje o patofiziologiji AB i potencijalno služi kao terapijski target.

### **5.1. Suplementacija visokim dozama ribljeg ulja**

Postoje dokazi da suplementacija visokim dozama RU može značajno smanjiti rizik od nastanka AB, kao i da godinama odloži početak ispoljavanja simptoma (Villa i sar., 2023). Posebno je važno naglasiti da nivoi omega-3 u mozgu ne prate nivo omega-3 u krvi, već su mnogo manji i da se zbog toga sugerise upotreba doza mnogo većih od trenutno preporučenih dnevnih doza da bi se postigao adjuvantni efekat u prevenciji i/ili terapiji neurodegenerativnih bolesti (Says, 2020). Preporučene dnevne doze RU-a od strane proizvođača su 360-540 mg EPK i 240-360 mg DHK. Međutim, sve se više preporučuje suplementacija mnogo većim dozama (do 10 mg dnevno) (Arellanes i sar., 2020). Čak se i trudnicama preporučuje 250-500 mg EPK i DPK dnevno (od čega minimalno 200 mg treba da bude DHK) (Burlingame i sar., 2009). Evropska agencija za bezbednost hrane preporučuje dodatnih 100-200 mg DHK dnevno.

Istraživanje Jović i saradnika je pokazalo da presimptomatski tretman višim dozama RU-a u trajanju od tri nedelje stimuliše formiranje fizičke barijere oko amiloidnih plaka, što potvrđuje značajan pozitivan efekat tretmana visokim dozama RU-a. Neophodno je istaći da smo tretman RU-em radili u presimptomatskoj fazi AB da bi se postigao veći efekat dok još uvek nije došlo do ispoljavanja kognitivnih promena i značajnog nagomilavanja amiloida. Takođe, klinička istraživanja sugerisu da bi suplementacija sa DHK mogla poboljšati pamćenje kod pacijenata sa blagim kognitivnim poremećajem ali ne i kod AB pacijenata sa uznapredovalim kognitivnim poremećajem, što ukazuje na značaj rane intervencije u presimptomatskoj fazi AB (Kotani i sar., 2006).

### **5.2. Promene u homeostazi metabolizma holesterola u fiziološkom i patološkom starenju kao i nakon tretmana ribljim uljem**

Pokazano je da postoji veza između A $\beta$  peptida i holesterola i to na način da postoji A $\beta$  vezivno mesto za holesterol (Habchi i sar, 2018). Iako nije poznata tačna priroda interakcije između holesterola i A $\beta$ , postoje dokazi da holesterol ima kapacitet da moduliše proizvodnju i uklanjanje A $\beta$  (Rudajev i Novotny, 2022). Pokazano je da holesterol može pojačati ili oslabiti agregaciju A $\beta$  na membranama kao i da utiče na strukturu amiloida i njegov potencijal da probije dvoslojnu membranu (Williams i Serpel, 2011; Yu i Zheng., 2012; Yip i sar., 2001; Phan i sar., 2013). U okviru AB holesterol ima višestruku ulogu. Može da ima protektivnu ulogu tako što ima veliki uticaj na vezivanje A $\beta$  za mebranu i oštećenja membrane nastala zbog nakupljanja A $\beta$ . Međutim, holesterol može i da pojača toksični efekat amiloida. Ovakav štetni efekat holesterola vezan je za lokalizaciju amiloidogenog procesovanja APP-a u lipidnim pontonima bogatim holesterolom. To znači da je precizna distribucija holesterola u okviru ćelijske membrane važna za određivanje efekta holestrola, tj. da li će on biti dobar ili loš. Distribucija holesterola je zavisna, pored ostalog, od stepena

njegove sinteze kao i od međucelijskog transporta holesterola regulisanog od strane APOE i ABC-transportera.

Uzimajući u obzir da je skoro 70% ukupne količine lipida, neophodnih za normalnu funkciju mrežnjače, sintetisano lokalno, analizirali smo ekspresiju ključnih gena koji regulišu metabolizam holesterola. Nivoi ključnih gena odgovornih za regulaciju sinteze holesterola *Lxrβ* i *Hmgcr* su znatno smanjeni u mrežnjači 5XFAD miševa u odnosu na WT, što je u korelaciji sa pokazanim smanjenim metabolizmom holesterola u mozgu kod ovog modela (Zhang i sar., 2023). Ovo smanjenje holesterola može da ima protektivnu ulogu tako što dovodi do smanjene inkorporacije Aβ u membrane. S druge strane, isto to smanjenje holesterola može da dovede do povećane Aβ agregacije i membranske apsorpcije koje je povezano sa povećanom amiloidnom toksičnošću (Liu i sar., 2015).

Suplementacija ribljim uljem je značajno poremetila nivoe ekspresije gena koji su uključeni u metabolizam holesterola i u mrežnjači i u MPE-u kod životinja divljeg soja. Značajno smanjenje ekspresije *Lxrβ* i *Hmgcr* (regulatora sinteze holesterola) i *Abcal* (transportera holesterola) je primećeno u mrežnjačama divljeg soja posle suplementacije RU-em (Karanth i sar. 2013; Cho i sar., 2015). Iako ove transkripcione promene nisu bile dovoljne da smanje nivo Hmgcr proteina u mrežnjači, postoji mogućnost da DHK snižava nivo *de novo* sinteze holesterola smanjenjem aktivnosti *Hmgcr*, dok *Hmgcr* proteinski i ekspresioni nivoi ostaju nepromenjeni. S obzirom na atenuiran metabolizam holesterola kod 5XFAD životinja kako u mozgu (Zhang i sar., 2023) tako i u mrežnjači, nije iznenađujuće da tretman RU-em nije pokazao značajan efekat na ekspresiju ispitivanih gena koji su uključeni u regulaciju metabolizma holesterola. *Abcal* i *ApoE* geni regulišu lipoprotein posredovani transport i eliminaciju holesterola. Kako *Lxrβ* primarno reguliše *Abcal* ekspresiju, smanjenje ekspresije *Lxrβ* u mrežnjači divljeg soja koje je pokazano u našoj studiji bi moglo da bude odgovorno za smanjenje regulacije *Abcal* ekspresije, i na transkripcionom i na translacionom nivou. Povećani nivoi *Abcal* i *Hmgcr* ekspresije su asociirani sa povećanom akumulacijom holesterola (Johnson i sar., 2003), koja je povezana sa nekoliko neurodegenerativnih bolesti mrežnjače, uključujući SMD (Pikuleva i Curcio, 2014), tako da smanjenje nivoa *Abcal* ekspresije kod divljeg soja ukazuje na neuroprotektivni efekat RU-a.

Iako su promene u sadržaju holesterola, njegovom metabolizmu i transportu definitivno povezani sa AB (Kirsch i sar., 2003; Runz i sar., 2002; Burns i Duff., 2002; Pincon i sar., 2015; Loera-Valencia i sar., 2019), još uvek je otvoreno pitanje da li holesterol igra ulogu u razvoju neurodegeneracije ili je promena njegove homeostaze samo posledica prethodne Aβ promovisane patologije. Takođe je bitno napomenuti da smanjenje količine holesterola i atenuirani holesterolski metabolizam kod 5XFAD miševa može da bude fiziološki proces koji ima za cilj da pomogne neuronima da se izbore sa stresom.

### **5.3. Promene u krvnim sudovima mrežnjače u fiziološkom i patološkom starenju kao i nakon tretmana ribljim uljem**

Pokazano je da su nakupljanje Aβ u krvnim sudovima mozga i CAA blisko povezani sa kognitivnim deficitom kod AB pacijenata i životinjskih modela AB. CAA nastaje kao posledica smanjenog uklanjanja amiloida iz parenhima mozga (Weller i Nicoll, 2005; Carrare i sar., 2008; 2013), poremećenog amiloidnog transporta kroz endotelijum, i neuspele degradacije amiloida (Carare i sar., 2008; Deane i sar., 2009; Zlokovic i sar., 2010; Keable i sar., 2016). Slično nakupljanje amiloida je primećeno i u krvnim sudovima mrežnjače kod

AB životinjskih modela i kod AB pacijenata (Koronyo i sar., 2017; La Morgia i sar., 2016; Shi i sar., 2020; Liu i sar., 2009) i označava se kao RAA (*engl.* retinal amyloid angiopathy). 5XFAD mišiji model AB koji smo koristili u istraživanju ima izražene karakteristike RAA.

Istraživanja pokazuju da je 5XFAD odličan model za ispitivanje cerebrovaskularnih promena kod AB zbog prisutnog nagomilavanja A $\beta$  u krvnim sudovima mozga (Herzig i sar., 2004; Janota i sar., 2015; Janota i sar., 2016; Montagne i sar., 2015; 2016) mada su istraživanja slične prirode u mrežnjači 5XFAD miševa retka. Sve je više dokaza o patofiziološkoj ulozi poremećenog uklanjanja amiloida kod mišijih modela AB (Iliff i sar., 2012; 2014).

S obzirom da akumulacija A $\beta$  u krvnim sudovima mrežnjače prethodi nagomilavanju A $\beta$  u mozgu kod mišijih modela AB (Shi i sar., 2021) ispitivanje krvnih sudova oka može imati značajan dijagnostički potencijal.

Dva glavna mehanizma odgovorna za nagomilavanje A $\beta$  u krvnim sudovima mrežnjače su poremećena transcitoza i poremećen glimfatički sistem, čiji su regulatori MFSD2A, odnosno AQP4.

Naše otkriće da RU povećava ekspresiju MFSD2A stavlja MFSD2A u fokus istraživanja zbog mogućnosti da njegova pojačana ekspresija može sačuvati integritet KMB i bude potencijalni univerzalni target za simptomatske terapije tokom normalnog starenja i u slučaju različitih patologija. Međutim, nema dovoljno studija koje se bave promenama ekspresije MFSD2A u krvnim sudovima mrežnjače pacijenata koji boluju od AB. Mi smo u našem istraživanju primetili značajan pad u ekspresiji MFSD2A u 4M (3,87 puta) i 12M (15,53 puta) 5XFAD mrežnjačama koje ukazuju na kompromitovanu KMrB. Skorašnja otkrića pokazuju da poremećeni nivoi transcitoze pogađaju propustljivost KMB (Ben-Zvi i sar., 2014; Knowland i sar., 2014). Transcitoza je predložena kao glavni mehanizam funkcionisanja KMB, i pravilno odvijanje transcitoze u CNS-u je neophodno za pravilnu funkciju KMB (Andreone i sar., 2017). MFSD2A je glavni regulator transcitoze u endotelnim ćelijama KMB u CNS-u (Andreone i sar., 2017; Ben-Zvi i sar., 2014; Yang i sar., 2017). Pokazano je da je povećana transcitoza vezikula u endotelijalnim ćelijama kod MFSD2A<sup>-/-</sup> miša odgovorna za povećanu propustljivost KMB. Skorašnja otkrića ukazuju na to da virusom indukovana prekomerna ekspresija MFSD2A može da ublaži poremećaje u učenju i pamćenju. Tokom starenja je u mikrovaskulaturi mozga zapaženo značajno smanjenje ekspresije MFSD2A (26% kod 12 meseci starog miša i 29% kod 24 meseca starog miša).

Ispitivali smo i efekat tretmana RU-em na promenu ekspresiju MFSD2A koja je poremećena tokom AB. U našem istraživanju suplementacija visokim dozama ribljev ulja koja je započeta kod 3 meseca starih WT miševa i trajala 21 dan je značajno povećala ekspresioni nivo glavnog DHK transportera, MFSD2A na transkripcionom i translacionom nivou. MFSD2A se prevashodno eksprimira u endotelnim ćelijama mrežnjače (Lobanova i sar., 2019), a analiza njegove ekspresije na krvnim sudovima je pokazala povećanje od 30,2 puta kod divljeg soja i 2,2 puta kod 5XFAD posle samo tri nedelje tretmana. Jedan način regulisanja MFSD2A ekspresije bi mogao da bude Srebp put, čija ekspresija je značajno povećana u očima MFSD2A nokaut miša (Wong i Silver, 2020; Chan i sar., 2018). Slično ovome, snižena regulacija MFSD2A kod dijabetične retinopatije je asocirana sa indukcijom Srebp signalnog puta (Zhang i sar., 2021). Pokazali smo da je ekspresija Srebp-1c simultano povećana sa smanjenjem MFSD2A ekspresije kod 4M 5XFAD mrežnjača. Međutim, iako je ekspresija MFSD2A kod 12M starih mrežnjača i kod 5XFAD i kod divljeg soja smanjena u poređenju sa 4M WT mrežnjačama, nivoi SREBP-1C su bili nepromenjeni što ukazuje na postojanje dodatnih mehanizama regulacije ekspresije MFSD2A.



SREBP-1C ekspresija je regulisana putem LXR, transkripcionog faktora koji je odgovoran za integraciju puteva ulaska i izlaska holesterola. Postoje dva responsivna elementa (LXREs) na Srebp1-c promotoru, i pokazano je da DHK inhibira vezivanje LXR/RXR heterodimera za LXREs na – SREBP1-C promotoru i dovode do značajnog snižavanja nivoa Srebp1c iRNK (Logette i sar., 2005). Međutim, ostaje nejasno da li suplementacija RU-em snižava nivo SREBP1-C direktno ili kroz povećanu regulaciju MFSD2A.

Lipidni sastav endotelnih ćelija u CNS-u, posebno sadržaj holesterola, je predložen kao ključni faktor u regulaciji transcitoze i propustljivosti barijere (Andreone i sar., 2017), a MFSD2A je identifikovan kao transporter lipida koji isporučuje DHK u mozak (Nguyen i sar., 2014). Predloženi mehanizam pokazuje da povećani nivoi DHK uzrokuju izmeštanje holesterola i CAV-1 u membrane time inhibirajući formiranje kaveola i transcitozu (Chen i Subbiah, 2007). Dakle, snižena regulacija sinteze holesterola kod 5XFAD mrežnjača može da bude kompenzatorni mehanizam sa ciljem da smanji povećanu transcitozu.

Studije su pokazale da tretman sa Lxr agonistom T0901317 indukuje povećanje MFSD2A ekspresije (Chan i sar., 2018), a sekvenciranje pomoću imunoprecipitacije (ChIPseq) i studije genskog niza (gene array) su otkrile LXR $\beta$  vezujuća mesta na mišijem MFSD2A intronu 3 (Boergesen i sar., 2012). Smanjena ekspresija LXR $\beta$  tokom starenja u mrežnjačama divljeg soja može da bude jedan od molekularnih mehanizama koji dovodi do smanjene ekspresije MFSD2A. Tokom tretmana RU-em dolazi do porasta ekspresije MFSD2A i kod divljeg soja i kod 5XFAD, bez porasta ekspresije Lxr $\beta$ , što znači da pod tretmanom drugi signalni putevi vrše regulaciju ekspresije MFSD2A. Jedan takav signalni put bi mogao da bude Wnt signalni put. Miševi kojima nedostaje LRP5 ili Norrin pokazuju povećanu vaskularnu propustljivost (Wang i sar., 2020). Wnt signalni put direktno reguliše transkripciju specifičnog inhibitora transcitoze, Mfsd2a, na  $\beta$ -catenin-zavisan način, i prekomerna ekspresija MFSD2A „spašava” Wnt-deficijentnu transcitozu u endotelnim ćelijama (Wang i sar., 2020). Pokazano je da DHK pojačava ekspresiju Wnt signalnog puta kod ljudskih neuronalnih progenitorskih ćelija. Ova regulacija je direktno zavisna od količine DHK. Wnt signalizacija je ključna za održavanje KMrB i KMB u fiziološkim uslovima, a poremećena Wnt signalizacija je primećena u nekoliko bolesti mrežnjače koje dovode do slepila. Potrebno je detaljnije razumevanje potencijalnih interakcija Wnt signalnog puta sa omega-3 masnim kiselinama za bolje razumevanje mehanizama putem kojih RU reguliše ekspresiju MFSD2A.

Sve navedeno potvrđuje da visoka doza suplementacije RU-em može da služi kao potencijalni adjuvant u terapijama, ili kao profilaksa u ranim stadijumima bolesti u slučaju poremećene KMrB kroz pozitivnu regulaciju MFSD2A ekspresije. Skorašnja otkrića pružaju uvid u molekularne strukture pretpostavljenog DHK vezujućeg mesta na MFSD2A receptoru, time otvaraju prostor za razvoj novih neuroterapeutskih agenasa koji mogu da se vezuju za to mesto i da uspešno prolaze KMrB (Cater i sar., 2021). Ako bi adjuvantna suplementacija ribljim uljem mogla da poveća broj vezujućih mesta potencijalnog kandidata za terapiju, efekat leka koji bi inače teško prolazio KMrB bi bio značajno poboljšan.

Još jedan mehanizam koji učestvuje u nagomilavanju A $\beta$  je disfunkcionalni glimfatički sistem i njegova nemogućnost da efikasno uklanja amiloid iz krvnih sudova. U oku glodara je identifikovan sistem limfne drenaže, koji se zasniva na AQP4-zavisnom putu uklanjanja tečnosti i metabolita. AQP4 se eksprimira na glijskim ćelijama koje predstavljaju podršku vaskulaturi mrežnjače (stopala astrocita u mozgu i MG ćelije u mrežnjači) (Simon i sar., 2022; Katoozi i sar., 2020). Pokazano je da nivoi AQP4 u mrežnjači rastu sa starošću (Zeppenfeld i sar., 2017) i da gubitak AQP4 značajno povećava nagomilavanje amiloida u

cerebralnom korteksu 5XFAD miševa (Xu i sar., 2015; Smith i sar., 2019). Dodatno, inhibicija AQP4 sa dodatkom inhibitora, malog molekula, TGN-020, smanjuje drenažu A $\beta$ 40 putem cerebralnih krvnih sudova (Rosu i sar., 2020). Ova otkrića sugerisu da AQP4 ima ključnu ulogu u mehanizmima kojim glijsko-limfni sistem utiče na nagomilavanje A $\beta$  u krvnim sudovima. Prema tome, povećana ekspresija AQP4 koju smo primetili u mrežnjačama 4M i 12M 5XFAD, i 12M WT miševa mogla bi da bude kompenzatorni mehanizam koji je indukovano nagomilavanjem A $\beta$  u krvnim sudovima mrežnjače. Prilikom ispitivanja efekta RU-a na funkciju glimfatičkog sistema pokazali smo da je došlo do značajnog smanjenja ekspresije AQP4 kako na nivou iRNK tako i na nivou proteina kod 5XFAD, dok kod divljeg soja dolazi samo do promena na nivou RNK, ali ne i proteina. Ovi rezultati pokazuju da tretman RU-em koji smanjuje ekspresiju AQP4 može pozitivno da utiče na očuvanje funkcije glimfatičkog sistema u oku kod modela AB.

Kao jedna od posledica fiziološkog (Kress i sar., 2014) i patološkog (Simon i sar., 2022; Zeppenfeld i sar., 2017) starenja se javlja i promena lokalizacije Aqp4 u ćeliji što bi moglo da dovede do usporavanja funkcije glimfatičkog sistema i posledično do agregacije proteina i neurodegeneracije (Ciappelloni i sar., 2019). Naša istraživanja pokazuju da je perivaskularna ekspresija AQP4 smanjena kod 12M 5XFAD i 12M WT mrežnjača što znači da je pogrešna lokalizacija AQP4 kod 5XFAD mrežnjača asocirana sa starenjem i sa napretkom patologije AB. Pod tretmanom RU-em nije bilo značajnih promena u perivaskularnoj ekspresiji AQP4. Objašnjenje bi moglo da bude u tome da do gubitka perivaskularne ekspresije dolazi kasnije tokom starenja (Zeppenfeld i sar., 2018). Takođe je pokazano je da tretman RU-em štiti polarizaciju AQP4 i značajno povećava efikasnost čišćenja A $\beta$  iz mozga (Ren i sar., 2017) ukazujući na potencijal za ciljanu manipulaciju glimfatičkog sistema. Iz ovoga možemo zaključiti da bi regulacija lokalizacije AQP4 mogla da postane koristan target za terapije koje su posebno dizajnirane da deluju na AB patologiju i posledice akumulacije amiloida.

Tretman RU je doveo do značajnih promena u ekspresiji MFSD2A i AQP4 na krvnim sudovima u mrežnjačama i kod životinja divljeg soja i kod 5XFAD miševa. Pokazane promene ukazuju na moguću korekciju poremećene funkcije KMrB što bi moglo da utiče na smanjenje nakupljanja A $\beta$  u krvnim sudovima. Hteli smo da ispitamo da li tretman RU-em može da utiče na smanjenje nivoa A $\beta$  u krvnim sudovima mrežnjače. Bojenje 6E10 antitelom koje obeležava A $\beta$  i lektinom koji obeležava krvne sudove je pokazalo značajan pad ekspresije A $\beta$  u krvnim sudovima 5XFAD mrežnjača (21%). Ovi rezultati potvrđuju protektivan efekat tretmana RU-em na akumulaciju A $\beta$  u krvnim sudovima mrežnjače. Objašnjenje bi moglo da bude da dolazi do korekcije poremećenih mehanizama transcitoze i glimfatičkog sistema i to na sledeći način: DHK iz RU-a deluje na kaveolin premeštajući ga iz vezikula u ćelijsku membranu i na taj način smanjuje propustljivost membrane i smanjuje nagomilavanje A $\beta$ , dok se holesterol inkorporira u lipidne pontone membrana da bi odnos DHK/holesterol u membrani bio izbalansiran. Takođe, RU smanjuje ekspresiju AQP4 i na taj način reguliše poremećeno funkcionisanje glimfatičkog sistema čime se smanjuje nagomilavanje A $\beta$  u krvnim sudovima (Yan i sar., 2020).

#### **5.4. Promene u MPE-u u fiziološkom i patološkom starenju kao i nakon tretmana ribljim uljem**

Tokom starenja i bolesti asociranih sa starenjem dolazi do poremećaja u metabolizmu kako holesterola tako i metabolita nastalih tokom procesa vizuelnog ciklusa u MPE-u. Ti

poremećaji inhibiraju proces autofagije u MPE-u aktiviranjem enzima kisele sfingomijelinaze, što može da poremeti vizuelnu kaskadu. Holesterol kao ključni lipid u sastavu membrane ima važnu ulogu u procesu vizuelnog ciklusa retinala i poremećen nivo holesterola u membranama može da utiče na pravilno odvijanje vizuelnog ciklusa (Tsin i sar., 2018). Deregulacija gena vizuelnog ciklusa dovodi do smanjene funkcije širokog spektra proteina koji su uključeni u regulaciju ove kaskade i odgovorni su za nekoliko tipova degeneracija mrežnjače i MPE-a (Masuda i sar., 2014; Si i sar., 2023). Razlike u promeni u ekspresiji gena uključenih u sintezu i transport holesterola u MPE-u u odnosu na mrežnjaču bi mogle da budu prisutne zbog razlika u metabolizmu i izvorima holesterola između ova dva tkiva obzirom da holesterol u mrežnjači potiče iz dva izvora, endogene biosinteze i sistemske cirkulacije, a MPE ima i fagocitovane SS fotoreceptora kao treći izvor holesterola (Fliesler i sar., 2010; Tserentsoodol i sar. ; 2006, Bonilha i sar., 2004 ). Tokom patološkog starenja praćenog 12 meseci nivoi ekspresije gena uključenih u metabolizam holesterola ostaju atenuirani i nepromenjeni do ispitivanog uzrasta od 12 M, pa do promena možda dolazi kasnije tokom starenja Primećeni porast ekspresije *Lxrb* tokom fiziološkog starenja u MPE-u bi mogao da nastane kao kompenzatorni mehanizam zbog pada ekspresije ovog gena u mrežnjači i međusobne povezanosti mrežnjače i MPE-a. Analiza proteinske ekspresije je pokazala pad ekspresije *Hmgcr* tokom fiziološkog starenja, što bi moglo da bude objašnjeno porastom *Lxrb* ekspresije. MPE može da eliminiše holesterol kroz bazolateralno izlučivanje lipoproteinskih partikula, što je posredovano putem *Abc1* i *ApoE*. Iako su mrežnjača i MPE intimno povezani i strukturno i funkcionalno (Strauss, 2005), oni se razlikuju u njihovim potrebama za holesterolom i n-3 PNMK homeostazi, što bi moglo da objasni njihov drugačiji odgovor na suplementaciju RU-em. Pokazali smo da dolazi do značajnog povećanja HMGCR (iRNK i proteina) i ABCA1 (iRNK) nivoa u MPE-u posle tretmana RU-em kod divljeg soja. Opisane promene u ekspresiji HMGCR i ABCA1 na transkripcionom i translacionom nivou bi mogle da budu objašnjene zaštitnom ulogom MPE-a kao „čuvara kapije”. Da bi kontrolisao fluks holesterola i nutrijenata iz sistemske cirkulacije i natrag u nju MPE mora da prilagođava svoju gensku ekspresiju na konstantne fluktuacije sadržaja iz krvi (Zheng i sar., 2012). Izostanak efekta RU-a na ekspresiju gena uključenih u metabolizam holesterola kod 5XFAD životinja bi se mogao objasniti njihovim inicijalno niskim nivoima ekspresije i u mrežnjači i u MPE-u na koje RU nije imalo uticaja.

Poznato je da je DHK neophodna za preživljavanje fotoreceptora, a da njeno preuzimanje, čuvanje i dopremanje do fotoreceptora obavlja MPE. Sa starenjem se smanjuje efikasnost MPE-a u obavljanju metaboličkih funkcija i fagocitoze zbog velike količine oksidativnog stresa (Wong i sar., 2016). Pored toga što reguliše transcitozu MFSD2A je prvobitno prepoznat kao glavni transporter DHK u oku (Wong i sar., 2016). Pored MFSD2A, važnu ulogu u transportu DHK ima Adiponektinski receptor 1 (ADIPOR1), koji učestvuje u održavanju stabilnog nivoa DHK u oku i neophodan je za pravilnu funkciju fotoreceptora i tokom razvića i kod adulta (Bazan, 2015). Povećanje ekspresije MFSD2A u MPE-u kod divljeg soja pod tretmanom RU-em pokazuje pozitivan efekat RU-a na mehanizme transcitoze, a odsustvo promena ekspresije *Srebp1-c* govori da su drugi mehanizmi uključeni u to povećanje, npr. delovanje preko Wnt signalnog puta. Važno je napomenuti da je nivo ekspresije *AdipoR1* značajno veći kod 5XFAD nego kod WT, tako da bi on mogao da ima ulogu glavnog transportera DHK u MPE-u kod 5XFAD. Ovo nam pokazuje da različiti mehanizmi deluju na transport DHK u MPE-u između divljeg soja i 5XFAD.

Postoje podaci da DHK može imati protektivnu ulogu u poništavanju negativnog efekta koji određene supstance mogu imati na proces vizuelnog ciklusa i na taj način omogućiti njegovo pravilno odvijanje (Taveau i sar., 2020). Zato je ispitano i kako tretman RU-em deluje na ekspresiju ključnih gena odgovornih za pravilno funkcionisanje vizuelnog

ciklusa. Skorašnja otkrića sugeriraju da su *Sox9*, *Otx2* i *Lhx2* glavni regulatori ekspresije gena vizuelnog ciklusa (Masuda i sar., 2014). Važno je da ekspresija ovih gena u MPE-u nije promjenjena ni u fiziološkom ni u patološkom starenju, kao ni pod tretmanom RU-em kod divljeg soja i 5XFAD modela AB. Naša analiza ekspresije gena vizuelnog ciklusa pokazuje da fiziološko starenje ni AB nemaju uticaja na promenu ekspresije ključnih gena koji su glavni regulatori i pokazatelji funkcionalnog stanja MPE-e, a to su *Rpe65* i *Best1*. Postoji mogućnost da do tih promena dolazi kasnije, kod životinja starijih od 12M (Kolesnikov i sar., 2010). Naše istraživanje je pokazalo da tretman RU-em smanjuje ekspresiju *Sox9* gena, što je u skladu sa ispitivanjem u kome su korišćene PNMK da olakšaju simptome bola povezanog sa osteoartritisom (Kulkarni i sar. 2016). Takođe, postoji mogućnost da do promena ekspresije gena ne dolazi na transkripcionom već na translacionom ili postranslacionom nivou, obzirom da su bioinformatičke analize pokazale da više zajedničkih mikroRNK regulišu gene vizuelnog ciklusa pomoću mikroRNK degradacije ili translacione inhibicije (Masuda i sar., 2014). Pod tretmanom RU-em dolazi do promena ekspresije određenih gena vizuelnog ciklusa kod WT ali ne i 5XFAD, ali glavni regulatori funkcije MPE-a, *Rpe65* i *Best1* ostaju nepromenjeni tako da vizuelni ciklus ostaje očuvan. Odsutstvo promena pod tretmanom RU-em kod 5XFAD bi moglo da bude objašnjeno niskim i nepromenjenim nivoima holesterola pod tretmanom RU-em.

## 6. ZAKLJUČCI

Analizom dobijenih rezultata i na osnovu postavljenih ciljeva izvedeni su sledeći zaključci:

Ekspresija gena uključenih u metabolizam holesterola se menja tokom fiziološkog starenja, dok tokom patološkog starenja ostaje nepromenjena i u mrežnjači i u pigmentnom epitelu mrežnjače (MPE). Nivoi ključnih gena odgovornih za regulaciju sinteze holesterola *Lxrβ* i *Hmgcr*, kao i proteinska ekspresija HMGCR su značajno smanjeni u mrežnjači 5XFAD miševa u odnosu na divlji soj (WT). Tokom starenja dolazi do nagomilavanja Aβ u krvnim sudovima mrežnjače 5XFAD životinja, ali bez prisustva amiloidnih plaka.

Tokom fiziološkog i patološkog starenja smanjuje se genska i proteinska ekspresija *Mfsd2a*, glavnog regulatora transcitoze u mrežnjači neophodnog za preuzimanje DHA. Nivoi ekspresije su inicijalno značajno niži u mrežnjači 5XFAD ženki u poređenju sa WT.

Tokom fiziološkog i patološkog starenja u mrežnjači se povećava genska i proteinska ekspresija *Aqp4*, a istovremeno je smanjena perivaskularna ekspresija *Aqp4*.

Ekspresija gena koji učestvuju u vizuelnom ciklusu se ne menja ni tokom fiziološkog ni tokom patološkog starenja, od svih ispitivanih gena detektovano je samo smanjenje ekspresije *Rlbp1* u MPE tokom starenja.

Analiza ekspresije gena uključenih u metabolizam holesterola pokazala je da tronedeljni tretman ribljim uljem (RU) smanjuje ekspresiju *Lxrβ* i *Hmgcr* gena u mrežnjači divljeg soja dok primenjena suplementacija ne menja nizak nivo ekspresije navedenih gena u mrežnjači 5XFAD životinja. Tretman RU-em smanjuje ekspresiju *Abca1* gena u mrežnjači divljeg soja ali ima suprotan efekat kod 5XFAD životinja. Nije bilo efekta RU na ekspresiju *ApoE* ni u jednoj ispitivanoj grupi, kao ni na ekspresiju gena zaduženih za eliminaciju holesterola iz mrežnjače, *Cyp27* i *Cyp46*.

Ekspresija gena uključenih u vizuelni ciklus se menja nakon tretmana RU u mrežnjači i MPE divljeg soja, ali ne i kod 5XFAD. Analiza transkripcionih faktora uključenih u regulaciju vizuelnog ciklusa je pokazala da je ekspresija gena *Sox9* i *Otx2* u MPE-u promenjena nakon tretmana RU samo kod divljeg soja, dok je kod 5XFAD ostala nepromenjena. Analiza ekspresije glavnih MPE-specifičnih komponenti vizuelnog ciklusa pokazala je da tretman RU ne utiče na ekspresiju *Rpe65* iRNK a da smanjuje ekspresiju *Rdh5* gena kod divljeg soja. Analiza ekspresije gena nosača retinoidnih proteina (*Rlbp*, *Rbp1*), modulatora procesa sinteze u vizuelnom ciklusu (*Rgr*), gena regulatora ekspresije vizuelnog pigmenta (*Tyr1*, *TyrP1*, *i Dct*) kao i *Best1* gena, pokazala je da tretman RU povećava gensku ekspresiju *Tyr* a smanjuje ekspresiju *Rdh* kod životinja divljeg soja, dok na ostale gene ni tretman RU-em ni genotip nisu imali uticaja.

Tretman RU povećava gensku ekspresiju *Mfsd2a* kod divljeg soja a nema efekat na 5XFAD grupu, dok se ekspresija *Srebp1-c*, regulatora MFSD2A ekspresije, ne menja u MPE-u ni jedne ispitivane grupe.

Tronedeljni tretman ribljim uljem vraća povišenu iRNK i proteinsku ekspresiju *Aqp4*, glavnog regulatora glimfatičkog sistema u oku, koja je detektovana kod 5XFAD životinja na kontrolni nivo, dok perivaskularna ekspresija ostaje nepromenjena.

Tretman RU-em dovodi do značajnog smanjenja ekspresije A $\beta$  u krvnim sudovima mrežnjače 5XFAD miševa.

Ova istraživanja otkrivaju da tokom fiziološkog i patološkog starenja dolazi do poremećene ekspresije MFSD2A i AQP4 ekspresije, kao i do promene perivaskularne ekspresije AQP4 u krvnim sudovima mrežnjače, ukazujući na njihov značaj kao mogućih targeta za nove tretmane i adjuvantne terapije. Naša istraživanja su pokazala da je ekspresija MFSD2A pod značajnim uticajem faktora genotipa i da se taj uticaj povećava sa starenjem. Nasuprot ovome, na ekspresiju i vaskularnu polarizaciju AQP4 starenje je imalo najvažniji uticaj. Važno je naglasiti da je ekspresija gena koji regulišu sintezu holesterola (*Lxr $\beta$*  i *Hmgcr*) najviše pogođena uticajem genotipa. Ovo je posebno važno jer je nagomilavanje A $\beta$  zajednička karakteristika patologija tri neurodegenerativne bolesti koje su asocirane sa starenjem, AB, glaukom i SMD, za koje do sada nije pronađena adekvatna terapija (Xia i sar., 2022), pa je neophodan razvoj novih terapija koje regulišu poremećen mehanizam uklanjanja A $\beta$ .

Efekti RU-a su izraženiji u mrežnjači nego u MPE-u, što je u skladu sa protektivnom ulogom MPE-a. Najvažniji rezultat ovog istraživanja je da su ekspresioni nivoi MFSD2A, DHK transportera, povećani u mrežnjači miševa tretiranih RU-em, sa istovremenim povećanjem ekspresije MFSD2A na krvnim sudovima mrežnjače (1,32 puta). Naši rezultati pokazuju da bi suplementacija RU-em mogla da služi ili kao profilaksa u zdravom oku, ili kao adjuvant u razvijanju ciljanih terapija barijere tokom razvijenih simptoma bolesti. U tom slučaju, MFSD2A može da bude pravi kandidat za takve manipulacije, a suplementacija RU-em efikasan adjuvant.

## 7. LITERATURA

1. Ahn, J.H., Cho, H., Kim, J.-H., Kim, S.H., Ham, J.-S., Park, I., Suh, S.H., Hong, S.P., Song, J.-H., Hong, Y.-K., Jeong, Y., Park, S.-H., Koh, G.Y., 2019. Meningeal lymphatic vessels at the skull base drain cerebrospinal fluid. *Nature* 572, 62–66. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1419-5>
2. Ajith, T.A., 2018. A Recent Update on the Effects of Omega-3 Fatty Acids in Alzheimer's Disease. *Curr Clin Pharmacol* 13, 252–260. <https://doi.org/10.2174/1574884713666180807145648>
3. Albert, A., Boesze-Battaglia, K., 2005. The role of cholesterol in rod outer segment membranes, *Progress in lipid research*. DOI:10.1016/J.PLIPRES.2005.02.001.
4. Ana, R. da, Gliszczyńska, A., Sanchez-Lopez, E., Garcia, M.L., Krambeck, K., Kovacevic, A., Souto, E.B., 2023. Precision Medicines for Retinal Lipid Metabolism-Related Pathologies. *Journal of Personalized Medicine* 13, 635. <https://doi.org/10.3390/jpm13040635>
5. Andreone, B.J., Chow, B.W., Tata, A., Lacoste, B., Ben-Zvi, A., Bullock, K., Deik, A.A., Ginty, D.D., Clish, C.B., Gu, C., 2017. Blood-Brain Barrier Permeability Is Regulated by Lipid Transport-Dependent Suppression of Caveolae-Mediated Transcytosis. *Neuron* 94, 581-594.e5. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.03.043>
6. Antonetti, D.A., Silva, P.S., Stitt, A.W., 2021. Current understanding of the molecular and cellular pathology of diabetic retinopathy. *Nat Rev Endocrinol* 17, 195–206. <https://doi.org/10.1038/s41574-020-00451-4>
7. Arellanes, I.C., Choe, N., Solomon, V., He, X., Kavin, B., Martinez, A.E., Kono, N., Buennagel, D.P., Hazra, N., Kim, G., D'Orazio, L.M., McCleary, C., Sagare, A., Zlokovic, B.V., Hodis, H.N., Mack, W.J., Chui, H.C., Harrington, M.G., Braskie, M.N., Schneider, L.S., Yassine, H.N., 2020. Brain delivery of supplemental docosahexaenoic acid (DHA): A randomized placebo-controlled clinical trial. *EBioMedicine* 59, 102883. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2020.102883>
8. Bai, R., Guo, J., Ye, X.-Y., Xie, Y., Xie, T., 2022. Oxidative stress: The core pathogenesis and mechanism of Alzheimer's disease. *Ageing Res Rev* 77, 101619. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2022.101619>
9. Bazan, N., 2015. Adiponectin receptor 1 conserves docosahexaenoic acid and promotes photoreceptor cell survival. *Nature Communications*.
10. Bazan, N.G., Rodriguez de Turco, E.B., 2003. Retinal docosahexaenoic acid, age-related diseases, and glaucoma, in: *Advances in Cell Aging and Gerontology, Membrane Lipid Signaling in Aging and Age-Related Disease*. Elsevier, pp. 205–222. [https://doi.org/10.1016/S1566-3124\(03\)12011-1](https://doi.org/10.1016/S1566-3124(03)12011-1)
11. Bastiani, M., Parton, R.G., 2010. Caveolae at a glance. *Journal of Cell Science* 123, 3831–3836. <https://doi.org/10.1242/jcs.070102>

12. Basset, E. A., Wallace, V. A., 2012. Cell fate determination in the vertebrate retina. *Trends. Neurosci.* DOI. 10.1016/j.tins.2012.05.004
13. Beken, S., Dilli, D., Fettah, N., Kabatas, E., Zenciroğlu, A., Okumuş, N., 2013. The influence of fish-oil lipid emulsions on retinopathy of prematurity in very low birth weight infants: A randomized controlled trial. *Early human development* 90. <https://doi.org/10.1016/j.earlhumdev.2013.11.002>
14. Ben-Zvi, A., Lacoste, B., Kur, E., Andreone, B.J., Mayshar, Y., Yan, H., Gu, C., 2014. Mfsd2a is critical for the formation and function of the blood-brain barrier. *Nature* 509, 507–511. <https://doi.org/10.1038/nature13324>
15. Bergado, J.A., Almaguer, W., 2002. Aging and synaptic plasticity: a review. *Neural Plast* 9, 217–232. <https://doi.org/10.1155/NP.2002.217>
16. Björkhem, I., Maneau, S., 2004. Brain Cholesterol: Long Secret Life Behind a Barrier. *Artherosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*.
17. Boergesen, M., Pedersen, T.Å., Gross, B., van Heeringen, S.J., Hagenbeek, D., Bindsbøll, C., Caron, S., Lalloyer, F., Steffensen, K.R., Nebb, H.I., Gustafsson, J.-Å., Stunnenberg, H.G., Staels, B., Mandrup, S., 2012. Genome-wide profiling of liver X receptor, retinoid X receptor, and peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  in mouse liver reveals extensive sharing of binding sites. *Mol Cell Biol* 32, 852–867. <https://doi.org/10.1128/MCB.06175-11>
18. Bok, D., 1993. The retinal pigment epithelium: a versatile partner in vision. *Journal of Cell Science* 1993, 189–195. [https://doi.org/10.1242/jcs.1993.Supplement\\_17.27](https://doi.org/10.1242/jcs.1993.Supplement_17.27)
19. Bonilha, L., Rorden, C., Castellano, G., Pereira, F., Rio, P.A., Cendes, F., Li, L.M., 2004. Voxel-based morphometry reveals gray matter network atrophy in refractory medial temporal lobe epilepsy. *Arch Neurol* 61, 1379–1384. <https://doi.org/10.1001/archneur.61.9.1379>
20. Brown, M.S., Goldstein, J.L., 2009. Cholesterol feedback: from Schoenheimer's bottle to Scap's MELADL. *J. Lipid Res.* 50 Suppl, S15-27. <https://doi.org/10.1194/jlr.R800054-JLR200>
21. Brown, M.F., 1994. Modulation of rhodopsin function by properties of the membrane bilayer. *Chemistry and Physics of Lipids, Special Issue Functional Dynamics of Lipids in Biomembranes* 73, 159–180. [https://doi.org/10.1016/0009-3084\(94\)90180-5](https://doi.org/10.1016/0009-3084(94)90180-5)
22. Burke, S., N., Barnes, C., A., 2006. Neural plasticity in the ageing brain. *Nature Reviews Neuroscience*.
23. Burlingame, B., Nishida, C., Uauy, R., Weisell, R., 2009. Fats and fatty acids in human nutrition: introduction. *Ann Nutr Metab* 55, 5–7. <https://doi.org/10.1159/000228993>
24. Burns, M., Duff, K., 2002. Cholesterol in Alzheimer's Disease and Tauopathy. *Annals of the New York Academy of Sciences* 977, 367–375. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2002.tb04839.x>



25. Busik, J.V., Mohr, S., Grant, M.B., 2008. Hyperglycemia-induced reactive oxygen species toxicity to endothelial cells is dependent on paracrine mediators. *Diabetes* 57, 1952–1965. <https://doi.org/10.2337/db07-1520>
26. Carare, R.O., Bernardes-Silva, M., Newman, T.A., Page, A.M., Nicoll, J. a. R., Perry, V.H., Weller, R.O., 2008. Solutes, but not cells, drain from the brain parenchyma along basement membranes of capillaries and arteries: significance for cerebral amyloid angiopathy and neuroimmunology. *Neuropathol Appl Neurobiol* 34, 131–144. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2990.2007.00926.x>
27. Carare, R.O., Hawkes, C.A., Jeffrey, M., Kalaria, R.N., Weller, R.O., 2013. Review: cerebral amyloid angiopathy, prion angiopathy, CADASIL and the spectrum of protein elimination failure angiopathies (PEFA) in neurodegenerative disease with a focus on therapy. *Neuropathol Appl Neurobiol* 39, 593–611. <https://doi.org/10.1111/nan.12042>
28. Cater, R.J., Chua, G.L., Erramilli, S.K., Keener, J.E., Choy, B.C., Tokarz, P., Chin, C.F., Quek, D.Q.Y., Kloss, B., Pepe, J.G., Parisi, G., Wong, B.H., Clarke, O.B., Marty, M.T., Kossiakoff, A.A., Khelashvili, G., Silver, D.L., Mancina, F., 2021. Structural basis of omega-3 fatty acid transport across the blood–brain barrier. *Nature* 595, 315–319. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03650-9>
29. Chan, J.P., Wong, B.H., Chin, C.F., Galam, D.L.A., Foo, J.C., Wong, L.C., Ghosh, S., Wenk, M.R., Cazenave-Gassiot, A., Silver, D.L., 2018. The lysolipid transporter Mfsd2a regulates lipogenesis in the developing brain. *PLOS Biology* 16, e2006443. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2006443>
30. Chan, J.P., Wong, B.H., Chin, C.F., Galam, D.L.A., Foo, J.C., Wong, L.C., Ghosh, S., Wenk, M.R., Cazenave-Gassiot, A., Silver, D.L., 2018. The lysolipid transporter Mfsd2a regulates lipogenesis in the developing brain. *PLOS Biol.* 16, e2006443. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2006443>
31. Chen, S., Subbaiah, P.V., 2007. Phospholipid and fatty acid specificity of endothelial lipase: potential role of the enzyme in the delivery of docosahexaenoic acid (DHA) to tissues. *Biochim Biophys Acta* 1771, 1319–1328. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2007.08.001>
32. Chen, S., Popp, N.A., Chan, C.-C., 2014. Animal models of age-related macular degeneration and their translatability into the clinic. *Expert Rev. Ophthalmol.* 9, 285–295. <https://doi.org/10.1586/17469899.2014.939171>
33. Cho, H.J., Yoo, S.G., Kim, H.S., Kim, J.H., Kim, C.G., Lee, T.G., Kim, J.W., 2015. Risk factors for geographic atrophy after intravitreal ranibizumab injections for retinal angiomatous proliferation. *Am J Ophthalmol* 159, 285–292.e1. <https://doi.org/10.1016/j.ajo.2014.10.035>
34. Chiquita, S., Rodrigues-Neves, A.C., Baptista, F.I., Carecho, R., Moreira, P.I., Castelo-Branco, M., Ambrósio, A.F., 2019. The Retina as a Window or Mirror of the Brain Changes Detected in Alzheimer’s Disease: Critical Aspects to Unravel. *Mol Neurobiol* 56, 5416–5435. <https://doi.org/10.1007/s12035-018-1461-6>

35. Chouinard-Watkins, R., Bazinet, R.P., 2018. ACSL6 is critical for maintaining brain DHA levels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115, 12343–12345. <https://doi.org/10.1073/pnas.1817557115>
36. Ciappelloni, S., Bouchet, D., Dubourdieu, N., Boué-Grabot, E., Kellermayer, B., Manso, C., Marignier, R., Oliet, S.H.R., Tourdias, T., Groc, L., 2019. Aquaporin-4 Surface Trafficking Regulates Astrocytic Process Motility and Synaptic Activity in Health and Autoimmune Disease. *Cell Reports* 27, 3860-3872.e4. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.05.097>
37. Connor, K.M., SanGiovanni, J.P., Lofqvist, C., Aderman, C.M., Chen, J., Higuchi, A., Hong, S., Pravda, E.A., Majchrzak, S., Carper, D., Hellstrom, A., Kang, J.X., Chew, E.Y., Salem, N., Serhan, C.N., Smith, L.E.H., 2007. Increased dietary intake of omega-3-polyunsaturated fatty acids reduces pathological retinal angiogenesis. *Nat Med* 13, 868–873. <https://doi.org/10.1038/nm1591>
38. Cornwell, K, Fish Oil for AMD, Glaucoma, and Diabetic Retinopathy, 2022. *Ocular surface*.
39. Da Mesquita, S., Louveau, A., Vaccari, A., Smirnov, I., Cornelison, R.C., Kingsmore, K.M., Contarino, C., Onengut-Gumuscu, S., Farber, E., Raper, D., Viar, K.E., Powell, R.D., Baker, W., Dabhi, N., Bai, R., Cao, R., Hu, S., Rich, S.S., Munson, J.M., Lopes, M.B., Overall, C.C., Acton, S.T., Kipnis, J., 2018. Functional aspects of meningeal lymphatics in ageing and Alzheimer’s disease. *Nature* 560, 185–191. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0368-8>
40. de Pins, B., Cifuentes-Díaz, C., Farah, A.T., López-Molina, L., Montalban, E., Sancho-Balsells, A., López, A., Ginés, S., Delgado-García, J.M., Alberch, J., Gruart, A., Girault, J.-A., Giralt, A., 2019. Conditional BDNF Delivery from Astrocytes Rescues Memory Deficits, Spine Density, and Synaptic Properties in the 5XFAD Mouse Model of Alzheimer Disease. *J Neurosci* 39, 2441–2458. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2121-18.2019>
41. Deane, R., Bell, R.D., Sagare, A., Zlokovic, B.V., 2009. Clearance of amyloid-beta peptide across the blood-brain barrier: implication for therapies in Alzheimer’s disease. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 8, 16–30. <https://doi.org/10.2174/187152709787601867>
42. Duncan, J.L., 2009. Light Exposure and the Retina, in: *Frontiers in Optics 2009/Laser Science XXV/Fall 2009 OSA Optics & Photonics Technical Digest (2009)*, Paper FTuQ3. Presented at the Frontiers in Optics, Optica Publishing Group, p. FTuQ3. <https://doi.org/10.1364/FIO.2009.FTuQ3>
43. Egawa, J., Pearn, M.L., Lemkuil, B.P., Patel, P.M., Head, B.P., 2016. Membrane lipid rafts and neurobiology: age-related changes in membrane lipids and loss of neuronal function. *J Physiol* 594, 4565–4579. <https://doi.org/10.1113/JP270590>
44. Ferrer, I., García, M.A., González, I.L., Lucena, D.D., Villalonga, A.R., Tech, M.C., Llorens, F., Garcia-Esparcia, P., Martinez-Maldonado, A., Mendez, M.F., Escribano, B.T., Bech-Serra, J.J., Sabido, E., de la Torre Gómez, C., del Rio, J.A., 2018. Aging-related tau

astrogliopathy (ARTAG): not only tau phosphorylation in astrocytes. *Brain Pathology* 28, 965–985. <https://doi.org/10.1111/bpa.12593>

45. Fliesler, S.J., Florman, R., Rapp, L.M., Pittler, S.J., Keller, R.K., 1993. In vivo biosynthesis of cholesterol in the rat retina. *FEBS Lett.* 335, 234–238. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(93\)80736-e](https://doi.org/10.1016/0014-5793(93)80736-e)

46. Fliesler, S.J., Bretillon, L., 2010. The ins and outs of cholesterol in the vertebrate retina. *Journal of Lipid Research* 51, 3399–3413. <https://doi.org/10.1194/jlr.R010538>

47. Forrester, J.V., Dick, A.D., McMenamin, P.G., Roberts, F., Pearlman, E., 2015. *The Eye E-Book: The Eye E-Book*. Elsevier Health Sciences.

48. Frank-Kamenetsky, M., Grefhorst, A., Anderson, N.N., Racie, T.S., Bramlage, B., Akinc, A., Butler, D., Charisse, K., Dorkin, R., Fan, Y., Gamba-Vitalo, C., Hadwiger, P., Jayaraman, M., John, M., Jayaprakash, K.N., Maier, M., Nechev, L., Rajeev, K.G., Read, T., Röhl, I., Soutschek, J., Tan, P., Wong, J., Wang, G., Zimmermann, T., de Fougères, A., Vornlocher, H.-P., Langer, R., Anderson, D.G., Manoharan, M., Kotliansky, V., Horton, J.D., Fitzgerald, K., 2008. Therapeutic RNAi targeting PCSK9 acutely lowers plasma cholesterol in rodents and LDL cholesterol in nonhuman primates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 11915–11920. <https://doi.org/10.1073/pnas.0805434105>

49. Gabrielle, P.-H., 2022. Lipid metabolism and retinal diseases. *Acta Ophthalmologica* 100, 3–43. <https://doi.org/10.1111/aos.15226>

50. Govindpani, K., McNamara, L.G., Smith, N.R., Vinnakota, C., Waldvogel, H.J., Faull, R.L., Kwakowsky, A., 2019. Vascular Dysfunction in Alzheimer's Disease: A Prelude to the Pathological Process or a Consequence of It? *J Clin Med* 8, 651. <https://doi.org/10.3390/jcm8050651>

51. Gall, C., 2006. Synaptic plasticity in early aging. *Ageing Research Reviews*.

52. Garrity, J., 2022. Effects of Aging on the Eyes, *Mayo Clinic College of Medicine and Science*.

53. Grimm, M.O.W., Mett, J., Grimm, H.S., Hartmann, T., 2017. APP Function and Lipids: A Bidirectional Link. *Front Mol Neurosci* 10, 63. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00063>

54. Guo, L., Ravindran, N., Shamsher, E., Hill, D., Cordeiro, M.F., 2021. Retinal Changes in Transgenic Mouse Models of Alzheimer's Disease. *Curr Alzheimer Res* 18, 89–102. <https://doi.org/10.2174/1567205018666210414113634>

55. Habchi, J., Chia, S., Galvagnion, C., Michaels, T.C.T., Bellaiche, M.M.J., Ruggeri, F.S., Sanguanini, M., Idini, I., Kumita, J.R., Sparr, E., Linse, S., Dobson, C.M., Knowles, T.P.J., Vendruscolo, M., 2018. Cholesterol catalyses A $\beta$ 42 aggregation through a heterogeneous nucleation pathway in the presence of lipid membranes. *Nature Chem* 10, 673–683. <https://doi.org/10.1038/s41557-018-0031-x>

56. Hao, W., Wenzel, A., Obin, M., Chen, C.-K., Brill, E., Krasnoperova, N., Eversole-Cire, P., Kleyner, Y., Taylor, A., Simon, M., Grimm, C., Remé, C., Lem, J., 2002. Evidence for two apoptotic pathways in light-induced retinal degeneration. *Nature genetics* 32, 254–60. <https://doi.org/10.1038/ng984>

57. Harris, W. S., Miller, M., Tighe, A., P., Davidson, M. H., Schaefer, E. J., 2008. Omega-3 fatty acids and coronary heart disease risk: Clinical and mechanistic perspectives. *Artherosclerosis*.
58. Harrison, I.F., Ismail, O., Machhada, A., Colgan, N., Ohene, Y., Nahavandi, P., Ahmed, Z., Fisher, A., Meftah, S., Murray, T.K., Ottersen, O.P., Nagelhus, E.A., O'Neill, M.J., Wells, J.A., Lythgoe, M.F., 2020. Impaired glymphatic function and clearance of tau in an Alzheimer's disease model. *Brain* 143, 2576–2593. <https://doi.org/10.1093/brain/awaa179>
59. Herzig, M.C., Winkler, D.T., Burgermeister, P., Pfeifer, M., Kohler, E., Schmidt, S.D., Danner, S., Abramowski, D., Stürchler-Pierrat, C., Bürki, K., van Duinen, S.G., Maat-Schieman, M.L.C., Staufenbiel, M., Mathews, P.M., Jucker, M., 2004. Abeta is targeted to the vasculature in a mouse model of hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis. *Nat Neurosci* 7, 954–960. <https://doi.org/10.1038/nn1302>
60. Hobert, O., Westphal, H., 2000. Functions of LIM-homeobox genes. *Trends in Genetics* 16, 75–83. [https://doi.org/10.1016/S0168-9525\(99\)01883-1](https://doi.org/10.1016/S0168-9525(99)01883-1)
61. Honda, Z., Ishii, S., Shimizu, T., 2002. Platelet-Activating Factor Receptor. *The Journal of Biochemistry* 131, 773–779. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a003164>
62. Hopperton, K.E., Trépanier, M.-O., James, N.C.E., Chouinard-Watkins, R., Bazinet, R.P., 2018. Fish oil feeding attenuates neuroinflammatory gene expression without concomitant changes in brain eicosanoids and docosanoids in a mouse model of Alzheimer's disease. *Brain Behav Immun* 69, 74–90. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2017.11.002>
63. Horton, J.D., Goldstein, J.L., Brown, M.S., 2002. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J. Clin. Invest.* 109, 1125–1131. <https://doi.org/10.1172/JCI15593>
64. Hoshi, A., Yamamoto, T., Shimizu, K., Ugawa, Y., Nishizawa, M., Takahashi, H., Kakita, A., 2012. Characteristics of aquaporin expression surrounding senile plaques and cerebral amyloid angiopathy in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 71, 750–759. <https://doi.org/10.1097/NEN.0b013e3182632566>
65. Huang, Y., Zhang, W., Guo, X., Zhang, Y., Wu, J., Zu, H., 2023. Cellular cholesterol loss by DHCR24 knockdown leads to A $\beta$  production by changing APP intracellular localization. *Journal of Lipid Research* 64, 100367. <https://doi.org/10.1016/j.jlr.2023.100367>
66. Iliff, J.J., Wang, M., Liao, Y., Plogg, B.A., Peng, W., Gundersen, G.A., Benveniste, H., Vates, G.E., Deane, R., Goldman, S.A., Nagelhus, E.A., Nedergaard, M., 2012. A paravascular pathway facilitates CSF flow through the brain parenchyma and the clearance of interstitial solutes, including amyloid  $\beta$ . *Sci Transl Med* 4, 147ra111. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3003748>
67. Iliff, J.J., Chen, M.J., Plog, B.A., Zeppenfeld, D.M., Soltero, M., Yang, L., Singh, I., Deane, R., Nedergaard, M., 2014. Impairment of glymphatic pathway function promotes tau pathology after traumatic brain injury. *J Neurosci* 34, 16180–16193. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3020-14.2014>

68. Iwao, T., Takata, F., Matsumoto, J., Aridome, H., Yasunaga, M., Yokoya, M., Kataoka, Y., Dohgu, S., 2023. Aging decreases docosahexaenoic acid transport across the blood-brain barrier in C57BL/6J mice. *PLoS One* 18, e0281946. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0281946>
69. Jack Jr., C.R., Bennett, D.A., Blennow, K., Carrillo, M.C., Dunn, B., Haeberlein, S.B., Holtzman, D.M., Jagust, W., Jessen, F., Karlawish, J., Liu, E., Molinuevo, J.L., Montine, T., Phelps, C., Rankin, K.P., Rowe, C.C., Scheltens, P., Siemers, E., Snyder, H.M., Sperling, R., Contributors, Elliott, C., Masliah, E., Ryan, L., Silverberg, N., 2018. NIA-AA Research Framework: Toward a biological definition of Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia* 14, 535–562. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2018.02.018>
70. Janota, C., Lemere, C.A., Brito, M.A., 2016. Dissecting the Contribution of Vascular Alterations and Aging to Alzheimer's Disease. *Mol Neurobiol* 53, 3793–3811. <https://doi.org/10.1007/s12035-015-9319-7>
71. Janota, C.S., Brites, D., Lemere, C.A., Brito, M.A., 2015. Glio-vascular changes during ageing in wild-type and Alzheimer's disease-like APP/PS1 mice. *Brain Res* 1620, 153–168. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2015.04.056>
72. Jastrzebska, B., Debinski, A., Filipek, S., Palczewski, K., 2011. Role of membrane integrity on G protein-coupled receptors: Rhodopsin stability and function. *Progress in Lipid Research* 50, 267–277. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2011.03.002>
73. Jerotic, S., Maric, N., 2018. Structural retinal abnormalities as potential markers for psychosis spectrum disorders. *Medicinski podmladak* 69, 41–47. <https://doi.org/10.5937/mp69-18765>
74. Jerotić, S., 2022. Analiza strukture retine u poremećajima iz spektra psihoza: doktorska disertacija. [S. Jerotić], Beograd.
75. Jessen, F., Amariglio, R.E., van Boxtel, M., Breteler, M., Ceccaldi, M., Chételat, G., Dubois, B., Dufouil, C., Ellis, K.A., van der Flier, W.M., Glodzik, L., van Harten, A.C., de Leon, M.J., McHugh, P., Mielke, M.M., Molinuevo, J.L., Mosconi, L., Osorio, R.S., Perrotin, A., Petersen, R.C., Rabin, L.A., Rami, L., Reisberg, B., Rentz, D.M., Sachdev, P.S., de la Sayette, V., Saykin, A.J., Scheltens, P., Shulman, M.B., Slavin, M.J., Sperling, R.A., Stewart, R., Uspenskaya, O., Vellas, B., Visser, P.J., Wagner, M., Subjective Cognitive Decline Initiative (SCD-I) Working Group, 2014. A conceptual framework for research on subjective cognitive decline in preclinical Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 10, 844–852. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2014.01.001>
76. Li, J., Pora, B.L.R., Dong, K., Hasjim, J., 2021. Health benefits of docosahexaenoic acid and its bioavailability: A review. *Food Sci Nutr* 9, 5229–5243. <https://doi.org/10.1002/fsn3.2299>
77. Johnson, A.C.M., Yabu, J.M., Hanson, S., Shah, V.O., Zager, R.A., 2003. Experimental Glomerulopathy Alters Renal Cortical Cholesterol, SR-B1, ABCA1, and HMG CoA Reductase Expression. *Am J Pathol* 162, 283–291.

78. Jović, M., Lončarević-Vasiljković, N., Ivković, S., Dinić, J., Milanović, D., Zlokovic, B., Kanazir, S., 2019. Short-term fish oil supplementation applied in presymptomatic stage of Alzheimer's disease enhances microglial/macrophage barrier and prevents neuritic dystrophy in parietal cortex of 5XFAD mouse model. *PLoS One* 14, e0216726. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0216726>
79. Jung, E., Kong, S.Y., Ro, Y.S., Ryu, H.H., Shin, S.D., 2022. Serum Cholesterol Levels and Risk of Cardiovascular Death: A Systematic Review and a Dose-Response Meta-Analysis of Prospective Cohort Studies. *Int J Environ Res Public Health* 19, 8272. <https://doi.org/10.3390/ijerph19148272>
80. Karan, G., Lillo, C., Yang, Z., Cameron, D.J., Locke, K.G., Zhao, Y., Thirumalaichary, S., Li, C., Birch, D.G., Vollmer-Snarr, H.R., Williams, D.S., Zhang, K., 2005. Lipofuscin accumulation, abnormal electrophysiology, and photoreceptor degeneration in mutant ELOVL4 transgenic mice: a model for macular degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 4164–4169. <https://doi.org/10.1073/pnas.0407698102>
81. Karanth, S., Tran, V., Kuberan, B., Schlegel, A., 2013. Polyunsaturated fatty acyl-coenzyme As are inhibitors of cholesterol biosynthesis in zebrafish and mice. *Disease models and mechanisms*, 6, 1365-1377
82. Katoozi, S., Skauli, N., Zahl, S., Deshpande, T., Ezan, P., Palazzo, C., Steinhäuser, C., Frigeri, A., Cohen-Salmon, M., Ottersen, O.P., Amiry-Moghaddam, M., 2020. Uncoupling of the Astrocyte Syncytium Differentially Affects AQP4 Isoforms. *Cells* 9, 382. <https://doi.org/10.3390/cells9020382>
83. Keable, A., Fenna, K., Yuen, H.M., Johnston, D.A., Smyth, N.R., Smith, C., Salman, R.A.-S., Samarasekera, N., Nicoll, J.A.R., Attems, J., Kalaria, R.N., Weller, R.O., Carare, R.O., 2016. Deposition of amyloid  $\beta$  in the walls of human leptomeningeal arteries in relation to perivascular drainage pathways in cerebral amyloid angiopathy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1862, 1037–1046. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2015.08.024>
84. Kim, R.J., Wu, E., Rafael, A., Chen, E.L., Parker, M.A., Simonetti, O., Klocke, F.J., Bonow, R.O., Judd, R.M., 2000. The use of contrast-enhanced magnetic resonance imaging to identify reversible myocardial dysfunction. *N Engl J Med* 343, 1445–1453. <https://doi.org/10.1056/NEJM200011163432003>
85. Kimura, R., Ohno, M., 2009. Impairments in remote memory stabilization precede hippocampal synaptic and cognitive failures in 5XFAD Alzheimer mouse model. *Neurobiol Dis* 33, 229–235. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2008.10.006>
86. Kirsch, C., Eckert, G., Koudinov, A., Müller, W., 2003. Brain Cholesterol, Statins and Alzheimer's Disease. *Pharmacopsychiatry* 36 Suppl 2, S113-9. <https://doi.org/10.1055/s-2003-43058>
87. Kitajka, K., Sinclair, A.J., Weisinger, R.S., Weisinger, H.S., Mathai, M., Jayasooriya, A.P., Halver, J.E., Puskás, L.G., 2004. Effects of dietary omega-3 polyunsaturated fatty acids

- on brain gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 10931–10936. <https://doi.org/10.1073/pnas.0402342101>
88. Knowland, D., Arac, A., Sekiguchi, K.J., Hsu, M., Lutz, S.E., Perrino, J., Steinberg, G.K., Barres, B.A., Nimmerjahn, A., Agalliu, D., 2014. Stepwise recruitment of transcellular and paracellular pathways underlies blood-brain barrier breakdown in stroke. *Neuron* 82, 603–617. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.03.003>
89. Kolb, H., Fernandez, E. and Nelson, R., 2003. The organization of the vertebrate retina. *Webvision*. <http://webvision.med.utah.edu/>
90. Kolesnikov, A.V., Fan, J., Crouch, R.K., Kefalov, V.J., 2010. Age-Related Deterioration of Rod Vision in Mice. *J. Neurosci.* 30, 11222–11231. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4239-09.2010>
91. Koronyo, Y., Biggs, D., Barron, E., Boyer, D.S., Pearlman, J.A., Au, W.J., Kile, S.J., Blanco, A., Fuchs, D.-T., Ashfaq, A., Frautschy, S., Cole, G.M., Miller, C.A., Hinton, D.R., Verdooner, S.R., Black, K.L., Koronyo-Hamaoui, M., 2017. Retinal amyloid pathology and proof-of-concept imaging trial in Alzheimer’s disease. *JCI Insight* 2, e93621, 93621. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.93621>
92. Kotani, S., Sakaguchi, E., Warashina, S., Matsukawa, N., Ishikura, Y., Kiso, Y., Sakakibara, M., Yoshimoto, T., Guo, J., Yamashima, T., 2006. Dietary supplementation of arachidonic and docosahexaenoic acids improves cognitive dysfunction. *Neurosci Res* 56, 159–164. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2006.06.010>
93. Kress, B.T., Iliff, J.J., Xia, M., Wang, M., Wei, H.S., Zeppenfeld, D., Xie, L., Kang, H., Xu, Q., Liew, J.A., Plog, B.A., Ding, F., Deane, R., Nedergaard, M., 2014. Impairment of paravascular clearance pathways in the aging brain. *Ann Neurol* 76, 845–861. <https://doi.org/10.1002/ana.24271>
94. Kulkarni, P., Koppikar, S., Deshpande, S., Limaye, R., Gandhale, A., Harsulkar, A., 2016. OMEGA-3 fatty acids, a safe alternative, to alleviate osteoarthritis associated pain revealed through a clinical pilot study and modulation of linked genes in cultured synoviocytes. *Osteoarthritis and Cartilage* 24, S355. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2016.01.639>
95. Kumar, V., 2018. Eye is the Window to the Brain Pathology. *Curr. Adv. Ophthalmology*.
96. La Morgia, C., Ross-Cisneros, F.N., Koronyo, Y., Hannibal, J., Gallassi, R., Cantalupo, G., Sambati, L., Pan, B.X., Tozer, K.R., Barboni, P., Provini, F., Avanzini, P., Carbonelli, M., Pelosi, A., Chui, H., Liguori, R., Baruzzi, A., Koronyo-Hamaoui, M., Sadun, A.A., Carelli, V., 2016. Melanopsin retinal ganglion cell loss in Alzheimer disease. *Annals of Neurology* 79, 90–109. <https://doi.org/10.1002/ana.24548>
97. Lafuente, M., Rodríguez González-Herrero, M.E., Romeo Villadóniga, S., Domingo, J.C., 2021. Antioxidant Activity and Neuroprotective Role of Docosahexaenoic Acid (DHA) Supplementation in Eye Diseases That Can Lead to Blindness: A Narrative Review. *Antioxidants (Basel)* 10, 386. <https://doi.org/10.3390/antiox10030386>

98. Lamb, T.D., Pugh, E.N., Jr, 2006. Phototransduction, Dark Adaptation, and Rhodopsin Regeneration The Proctor Lecture. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 47, 5138–5152. <https://doi.org/10.1167/iovs.06-0849>
99. Langness, V.F., van der Kant, R., Das, U., Wang, L., Chaves, R. dos S., Goldstein, L.S.B., 2021. Cholesterol-lowering drugs reduce APP processing to A $\beta$  by inducing APP dimerization. *Mol Biol Cell* 32, 247–259. <https://doi.org/10.1091/mbc.E20-05-0345>
100. Lazar, A.N., Bich, C., Panchal, M., Desbenoit, N., Petit, V.W., Touboul, D., Dauphinot, L., Marquer, C., Lapr evote, O., Brunelle, A., Duyckaerts, C., 2013. Time-of-flight secondary ion mass spectrometry (TOF-SIMS) imaging reveals cholesterol overload in the cerebral cortex of Alzheimer disease patients. *Acta Neuropathol* 125, 133–144. <https://doi.org/10.1007/s00401-012-1041-1>
101. Ledesma, M.D., Abad-Rodríguez, J., Galvan, C., Biondi, E., Navarro, P., Delacourte, A., Dingwall, C., Dotti, C.G., 2003. Raft disorganization leads to reduced plasmin activity in Alzheimer’s disease brains. *EMBO Rep* 4, 1190–1196. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400021>
102. Léger-Charnay, E., Gambert, S., Martine, L., Dubus, E., Maire, M.-A., Buteau, B., Morala, T., Gigot, V., Bron, A.M., Bretillon, L., Masson, E.A.Y., 2022. Retinal cholesterol metabolism is perturbed in response to experimental glaucoma in the rat. *PLoS One* 17, e0264787. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0264787>
103. Li, J., Pora, B.L.R., Dong, K., Hasjim, J., 2021. Health benefits of docosahexaenoic acid and its bioavailability: A review. *Food Sci Nutr* 9, 5229–5243. <https://doi.org/10.1002/fsn3.2299>
104. Liang, F., Luo, C., Xu, G., Su, F., He, X., Long, S., Ren, H., Liu, Y., Feng, Y., Pei, Z., 2015. Deletion of aquaporin-4 is neuroprotective during the acute stage of micro traumatic brain injury in mice. *Neuroscience Letters* 598, 29–35. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2015.05.006>
105. Lim, J.K.H., Li, Q.-X., He, Z., Vingrys, A.J., Chinnery, H.R., Mullen, J., Bui, B.V., Nguyen, C.T.O., 2020. Retinal Functional and Structural Changes in the 5XFAD Mouse Model of Alzheimer’s Disease. *Front. Neurosci.* 14. <https://doi.org/10.3389/fnins.2020.00862>
106. Litman, B.J., Niu, S.L., Polozova, A., Mitchell, D.C., 2001. The role of docosahexaenoic acid containing phospholipids in modulating G protein-coupled signaling pathways: visual transduction. *J Mol Neurosci* 16, 237–242; discussion 279–284. <https://doi.org/10.1385/JMN:16:2-3:237>
107. Liu, C.-C., Kanekiyo, T., Xu, H., Bu, G., 2013. Apolipoprotein E and Alzheimer disease: risk, mechanisms and therapy. *Nat Rev Neurol* 9, 106–118. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2012.263>
108. Liu, X., Zhuang, P., Li, Y., Wu, F., Wan, X., Zhang, Y., Jiao, J., 2022. Association of fish oil supplementation with risk of incident dementia: A prospective study of 215,083 older adults. *Clin Nutr* 41, 589–598. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2022.01.002>



109. Liu, F., Shi, J., Tanimukai, H., Gu, Jinhua, Gu, Jianlan, Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Gong, C.-X., 2009. Reduced O-GlcNAcylation links lower brain glucose metabolism and tau pathology in Alzheimer's disease. *Brain* 132, 1820–1832. <https://doi.org/10.1093/brain/awp099>
110. Liu, P., Reed, M.N., Kotilinek, L.A., Grant, M.K.O., Forster, C.L., Qiang, W., Shapiro, S.L., Reichl, J.H., Chiang, A.C.A., Jankowsky, J.L., Wilmot, C.M., Cleary, J.P., Zahs, K.R., Ashe, K.H., 2015. Quaternary Structure Defines a Large Class of Amyloid- $\beta$  Oligomers Neutralized by Sequestration. *Cell Rep* 11, 1760–1771. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.05.021>
111. Lobanova, E.S., Schuhmann, K., Finkelstein, S., Lewis, T.R., Cady, M.A., Hao, Y., Keuthan, C., Ash, J.D., Burns, M.E., Shevchenko, A., Arshavsky, V.Y., 2019. Disrupted Blood-Retina Lysophosphatidylcholine Transport Impairs Photoreceptor Health But Not Visual Signal Transduction. *J Neurosci* 39, 9689–9701. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1142-19.2019>
112. Logette, E., Le Jossic-Corcus, C., Masson, D., Solier, S., Sequeira-Legrand, A., Dugail, I., Lemaire-Ewing, S., Desoche, L., Solary, E., Corcos, L., 2005. Caspase-2, a Novel Lipid Sensor under the Control of Sterol Regulatory Element Binding Protein 2. *Molecular and Cellular Biology* 25, 9621–9631. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.21.9621-9631.2005>
113. Loera-Valencia, R., Goikolea, J., Parrado-Fernandez, C., Merino-Serrais, P., Maioli, S., 2019. Alterations in cholesterol metabolism as a risk factor for developing Alzheimer's disease: Potential novel targets for treatment. *J Steroid Biochem Mol Biol* 190, 104–114. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2019.03.003>
114. Louveau, A., Smirnov, I., Keyes, T.J., Eccles, J.D., Rouhani, S.J., Peske, J.D., Derecki, N.C., Castle, D., Mandell, J.W., Kevin, S.L., Harris, T.H., Kipnis, J., 2015. Structural and functional features of central nervous system lymphatics. *Nature* 523, 337–341. <https://doi.org/10.1038/nature14432>
115. Livak, J., K., 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method. *Methods* 25, 402-408. [doi:10.1006/meth.2001.1262](https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262).
116. Ludwig, P., E., Lopez, J., M., Czyz, N., C., 2023. Embryology, Eye Malformations. National Institutes of Health.
117. Luo, J., Yang, H., Song, B.-L., 2020. Mechanisms and regulation of cholesterol homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 21, 225–245. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0190-7>
118. Mardaryev, A.N., Ahmed, M.I., Vlahov, N.V., Fessing, M.Y., Gill, J.H., Sharov, A.A., Botchkareva, N.V., 2010. Micro-RNA-31 controls hair cycle-associated changes in gene expression programs of the skin and hair follicle.
119. Marchesi, V.T., 2011. Alzheimer's dementia begins as a disease of small blood vessels, damaged by oxidative-induced inflammation and dysregulated amyloid metabolism: implications for early detection and therapy. *FASEB J* 25, 5–13. <https://doi.org/10.1096/fj.11-0102ufm> Martín, M.G.,

120. Martin, M.G., Perga, S., Trovò, L., Rasola, A., Holm, P., Rantamäki, T., Harkany, T., Castrén, E., Chiara, F., Dotti, C.G., 2008. Cholesterol Loss Enhances TrkB Signaling in Hippocampal Neurons Aging in Vitro. *Mol Biol Cell* 19, 2101–2112. <https://doi.org/10.1091/mbc.E07-09-0897>
121. Martín, M.G., Pfrieger, F., Dotti, C.G., 2014. Cholesterol in brain disease: sometimes determinant and frequently implicated. *EMBO Rep* 15, 1036–1052. <https://doi.org/10.15252/embr.201439225>
122. Martinez-Morales, J.R., 2016. Vertebrate Eye Gene Regulatory Networks, in: Castelli-Gair Hombría, J., Bovolenta, P. (Eds.), *Organogenetic Gene Networks: Genetic Control of Organ Formation*. Springer International Publishing, Cham, pp. 259–274. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-42767-6\\_9](https://doi.org/10.1007/978-3-319-42767-6_9)
123. Mason, R.P., Libby, P., Bhatt, D.L., 2020. Emerging Mechanisms of Cardiovascular Protection for the Omega-3 Fatty Acid Eicosapentaenoic Acid. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 40, 1135–1147. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.119.313286>
124. Masuda, T., Wahlin, K., Wan, J., Hu, J., Maruotti, J., Yang, X., Iacovelli, J., Wolkow, N., Kist, R., Dunaief, J.L., Qian, J., Zack, D.J., Esumi, N., 2014. Transcription Factor SOX9 Plays a Key Role in the Regulation of Visual Cycle Gene Expression in the Retinal Pigment Epithelium. *Journal of Biological Chemistry* 289, 12908–12921. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.556738>
125. Mattson, M.P., Arumugam, T.V., 2018. Hallmarks of Brain Aging: Adaptive and Pathological Modification by Metabolic States. *Cell Metabolism* 27, 1176–1199. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.05.011>
126. Mett, J., Hartmann, T., Grimm, M.O.W., 2016. Chapter 13 - The Effects of Glycerophospholipids and Fatty Acids on APP Processing: Implications for Alzheimer's Disease, in: Watson, R.R., De Meester, F. (Eds.), *Handbook of Lipids in Human Function*. AOCS Press, pp. 377–421. <https://doi.org/10.1016/B978-1-63067-036-8.00013-5>
127. Milanovic, D., Petrović, S., Brkic, M., Avramovic, V., Perovic, M., Ivkovic, S., Glibetic, M., Kanazir, S., 2018. Short-Term Fish Oil Treatment Changes the Composition of Phospholipids While Not Affecting the Expression of Mfsd2a Omega-3 Transporter in the Brain and Liver of the 5XFAD Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Nutrients* 10, 1250. <https://doi.org/10.3390/nu10091250>
128. Mirzaei, N., Shi, H., Oviatt, M., Doustar, J., Rentsendorj, A., Fuchs, D.-T., Sheyn, J., Black, K.L., Koronyo, Y., Koronyo-Hamaoui, M., 2020. Alzheimer's Retinopathy: Seeing Disease in the Eyes. *Front Neurosci* 14, 921. <https://doi.org/10.3389/fnins.2020.00921>
129. Moftakhar, P., Lynch, M.D., Pomakian, J.L., Vinters, H.V., 2010. Aquaporin expression in the brains of patients with or without cerebral amyloid angiopathy. *J Neuropathol Exp Neurol* 69, 1201–1209. <https://doi.org/10.1097/NEN.0b013e3181fd252c>
130. Montagne, A., Barnes, S.R., Sweeney, M.D., Halliday, M.R., Sagare, A.P., Zhao, Z., Toga, A.W., Jacobs, R.E., Liu, C.Y., Amezcua, L., Harrington, M.G., Chui, H.C., Law, M., Zlokovic, B.V., 2015. Blood-brain barrier breakdown in the aging human hippocampus. *Neuron* 85, 296–302. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.12.032>

131. Montagne, A., Nation, D.A., Pa, J., Sweeney, M.D., Toga, A.W., Zlokovic, B.V., 2016. Brain imaging of neurovascular dysfunction in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 131, 687–707. <https://doi.org/10.1007/s00401-016-1570-0>
132. Montine, T.J., Phelps, C.H., Beach, T.G., Bigio, E.H., Cairns, N.J., Dickson, D.W., Duyckaerts, C., Frosch, M.P., Masliah, E., Mirra, S.S., Nelson, P.T., Schneider, J.A., Thal, D.R., Trojanowski, J.Q., Vinters, H.V., Hyman, B.T., National Institute on Aging, Alzheimer's Association, 2012. National Institute on Aging-Alzheimer's Association guidelines for the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease: a practical approach. *Acta Neuropathol* 123, 1–11. <https://doi.org/10.1007/s00401-011-0910-3>
133. Morin, P.J., Abraham, C.R., Amaratunga, A., Johnson, R.J., Huber, G., Sandell, J.H., Fine, R.E., 1993. Amyloid precursor protein is synthesized by retinal ganglion cells, rapidly transported to the optic nerve plasma membrane and nerve terminals, and metabolized. *J Neurochem* 61, 464–473. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1993.tb02147.x>
134. Najm, S., Löfqvist, C., Hellgren, G., Engström, E., Lundgren, P., Hård, A.-L., Lapillonne, A., Sävman, K., Nilsson, A.K., Andersson, M.X., Smith, L.E.H., Hellström, A., 2017. Effects of a lipid emulsion containing fish oil on polyunsaturated fatty acid profiles, growth and morbidities in extremely premature infants: A randomized controlled trial. *Clin Nutr ESPEN* 20, 17–23. <https://doi.org/10.1016/j.clnesp.2017.04.004>
135. Neiteler, A., Palakkan, A.A., Gallagher, K.M., Ross, J.A., 2023. Oxidative stress and docosahexaenoic acid injury lead to increased necroptosis and ferroptosis in retinal pigment epithelium. *Sci Rep* 13, 21143. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-47721-5>
136. Nguyen, L.N., Ma, D., Shui, G., Wong, P., Cazenave-Gassiot, A., Zhang, X., Wenk, M.R., Goh, E.L.K., Silver, D.L., 2014. Mfsd2a is a transporter for the essential omega-3 fatty acid docosahexaenoic acid. *Nature* 509, 503–506. <https://doi.org/10.1038/nature13241>
137. Nolan, N. D., Jenny L., Wang N-K., Tsang S., 2021. Retinal pigment epithelium lipid metabolic demands and therapeutic restoration, National Institute of Health.
138. Nordberg, A., 2015. Towards early diagnosis in Alzheimer disease. *Nat. Rev. Neurol.* 11, 69–70. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2014.257>
139. Oakley, H., Cole, S.L., Logan, S., Maus, E., Shao, P., Craft, J., Guillozet-Bongaarts, A., Ohno, M., Disterhoft, J., Van Eldik, L., Berry, R., Vassar, R., 2006. Intraneuronal  $\beta$ -Amyloid Aggregates, Neurodegeneration, and Neuron Loss in Transgenic Mice with Five Familial Alzheimer's Disease Mutations: Potential Factors in Amyloid Plaque Formation. *J. Neurosci.* 26, 10129–10140. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1202-06.2006>
140. Oblak, A.L., Lin, P.B., Kotredes, K.P., Pandey, R.S., Garceau, D., Williams, H.M., Uyar, A., O'Rourke, R., O'Rourke, S., Ingraham, C., Bednarczyk, D., Belanger, M., Cope, Z.A., Little, G.J., Williams, S.-P.G., Ash, C., Bleckert, A., Ragan, T., Logsdon, B.A., Mangravite, L.M., Sukoff Rizzo, S.J., Territo, P.R., Carter, G.W., Howell, G.R., Sasner, M., Lamb, B.T., 2021. Comprehensive Evaluation of the 5XFAD Mouse Model for Preclinical Testing Applications: A MODEL-AD Study. *Front Aging Neurosci* 13, 713726. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2021.713726>

141. Okada-Iwabu, M., Yamauchi, T., Iwabu, M., Honma, T., Hamagami, K., Matsuda, K., Yamaguchi, M., Tanabe, H., Kimura-Someya, T., Shirouzu, M., Ogata, H., Tokuyama, K., Ueki, K., Nagano, T., Tanaka, A., Yokoyama, S., Kadowaki, T., 2013. A small-molecule AdipoR agonist for type 2 diabetes and short life in obesity. *Nature* 503, 493–499. <https://doi.org/10.1038/nature12656>
142. Orth, M., Bellosta, S., 2012. Cholesterol: Its Regulation and Role in Central Nervous System Disorders. *Cholesterol* 2012, 292598. <https://doi.org/10.1155/2012/292598>
143. Patch, C.S., Hill-Yardin, E.L., Lewis, M., Ryan, L., Daly, E., Pearce, A.J., 2021. The More, the Better: High-Dose Omega-3 Fatty Acids Improve Behavioural and Molecular Outcomes in Preclinical Models in Mild Brain Injury. *Curr Neurol Neurosci Rep* 21, 45. <https://doi.org/10.1007/s11910-021-01132-z>
144. Perry, V., Morris, R., Raisman, G., 1984. Is Thy-1 expressed only by ganglion cells and their axons in the retina and optic nerve? *Journal of neurocytology* 13, 809–24. <https://doi.org/10.1007/BF01148495>
145. Petrov, A.M., Astafev, A.A., Mast, N., Saadane, A., El-Darzi, N., Pikuleva, I.A., 2019. The Interplay between Retinal Pathways of Cholesterol Output and Its Effects on Mouse Retina. *Biomolecules* 9, 867. <https://doi.org/10.3390/biom9120867>
146. Phan, H.T.T., Hata, T., Morita, M., Yoda, T., Hamada, T., Vestergaard, M.C., Takagi, M., 2013. The effect of oxysterols on the interaction of Alzheimer’s amyloid beta with model membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1828, 2487–2495. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2013.06.021>
147. Pikuleva, I.A., Curcio, C.A., 2014. Cholesterol in the retina: The best is yet to come. *Progress in Retinal and Eye Research* 41, 64–89. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2014.03.002>
148. Su, H.J., 1998. Plaque biogenesis in brain aging and Alzheimer’s disease. II. Progressive transformation and developmental sequence of dystrophic neurites. Sigma-Aldrich [WWW Document], n.d. URL <https://www.sigmaaldrich.com/RS/en/tech-docs/paper/1442593> (accessed 7.25.24).
149. Plog, B.A., Dashnaw, M.L., Hitomi, E., Peng, W., Liao, Y., Lou, N., Deane, R., Nedergaard, M., 2015. Biomarkers of traumatic injury are transported from brain to blood via the glymphatic system. *J Neurosci* 35, 518–526. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3742-14.2015>
150. Pinçon, A., Thomas, M.H., Huguet, M., Allouche, A., Colin, J.C., Georges, A., Derrien, A., Lanhers, M.-C., Malaplate-Armand, C., Oster, T., Corbier, C., Pillot, T., Olivier, J.L., Yen, F.T., 2015. Increased susceptibility of dyslipidemic LSR<sup>+/-</sup> mice to amyloid stress is associated with changes in cortical cholesterol levels. *J Alzheimers Dis* 45, 195–204. <https://doi.org/10.3233/JAD-142127>
151. Poche, A., R., Furuta, Y., Chabboissier, M., Schedl, A., Behringer, R., 2008. Sox9 Is Expressed in Mouse Multipotent Retinal Progenitor Cells and Functions in Müller Glial Cell Development. *J. comp. neurol.*, doi: [10.1002/cne.21746](https://doi.org/10.1002/cne.21746)

152. Potić, J., 2018. Characterization of the mechanisms of photoreceptor degeneration during retinal detachment; the evaluation of postoperative anatomical and functional recovery. Универзитет У Београду
153. Prakash, G., Agrawal, R., Natung, T., 2017. Role of Lipids in Retinal Vascular and Macular Disorders. *Indian J Clin Biochem* 32, 3–8. <https://doi.org/10.1007/s12291-016-0560-2>
154. Pulgar, V.M., 2019. Transcytosis to Cross the Blood Brain Barrier, New Advancements and Challenges. *Front Neurosci* 12, 1019. <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.01019>
155. Querques, G., Forte, R., Souied, E.H., 2011. Retina and omega-3. *J Nutr Metab* 2011, 748361. <https://doi.org/10.1155/2011/748361>
156. Ramachandra Rao, S., Fliesler, S.J., 2021. Cholesterol homeostasis in the vertebrate retina: biology and pathobiology. *J Lipid Res* 62, 100057. <https://doi.org/10.1194/jlr.TR120000979>
157. Ratnayaka, J.A., Serpell, L.C., Lotery, A.J., 2015. Dementia of the eye: The role of amyloid beta in retinal degeneration. *Eye (Basingstoke)* 29, 1013–1026. <https://doi.org/10.1038/eye.2015.100>
158. Razmara, E., Azimi, H., Tavasoli, A.R., Fallahi, E., Sheida, S.V., Eidi, M., Bitaraf, A., Farjami, Z., Daneshmand, M.A., Garshasbi, M., 2020. Novel neuroclinical findings of autosomal recessive primary microcephaly 15 in a consanguineous Iranian family. *European Journal of Medical Genetics* 63, 104096. <https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2020.104096>
159. Reiss, K., Cornelsen, I., Husmann, M., Gimpl, G., Bhakdi, S., 2011. Unsaturated fatty acids drive disintegrin and metalloproteinase (ADAM)-dependent cell adhesion, proliferation, and migration by modulating membrane fluidity. *J Biol Chem* 286, 26931–26942. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.243485>
160. Ren, Z., Pliff, J.J., Yang, L., Yang, J., Chen, X., Chen, M.J., Giese, R.N., Wang, B., Shi, X., Nedergaard, M., 2013. ‘Hit & Run’ Model of Closed-Skull Traumatic Brain Injury (TBI) Reveals Complex Patterns of Post-Traumatic AQP4 Dysregulation. *J Cereb Blood Flow Metab* 33, 834–845. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2013.30>
161. Ren, H., Luo, C., Feng, Y., Yao, X., Shi, Z., Liang, F., Kang, J.X., Wan, J.-B., Pei, Z., Su, H., 2017. Omega-3 polyunsaturated fatty acids promote amyloid- $\beta$  clearance from the brain through mediating the function of the glymphatic system. *FASEB J* 31, 282–293. <https://doi.org/10.1096/fj.201600896>
162. Repa, J. J., Mangelsdorf, D. J., 2000. The role of orphan receptors in the regulation of cholesterol homeostasis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 16: 459 – 481.
163. Rodríguez, J.J., Yeh, C.-Y., Terzieva, S., Olabarria, M., Kulijewicz-Nawrot, M., Verkhratsky, A., 2014. Complex and region-specific changes in astroglial markers in the aging brain. *Neurobiology of Aging* 35, 15–23. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2013.07.002>
164. Rosu, G.-C., Catalin, B., Balseanu, T.A., Laurentiu, M., Claudiu, M., Kumar-Singh, S., Daniel, P., 2020. Inhibition of Aquaporin 4 Decreases Amyloid A $\beta$ 40 Drainage Around

Cerebral Vessels. *Mol Neurobiol* 57, 4720–4734. <https://doi.org/10.1007/s12035-020-02044-8>

165. Rotstein, N.P., Aveldaño, M.I., Barrantes, F.J., Politi, L.E., 1996. Docosahexaenoic Acid Is Required for the Survival of Rat Retinal Photoreceptors In Vitro. *Journal of Neurochemistry* 66, 1851–1859. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1996.66051851.x>

166. Rudajev, V., Novotny, J., 2022. Cholesterol as a key player in amyloid  $\beta$ -mediated toxicity in Alzheimer's disease. *Front Mol Neurosci* 15, 937056. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2022.937056>

167. Runz, H., Rietdorf, J., Tomic, I., Bernard, M. de, Beyreuther, K., Pepperkok, R., Hartmann, T., 2002. Inhibition of Intracellular Cholesterol Transport Alters Presenilin Localization and Amyloid Precursor Protein Processing in Neuronal Cells. *J. Neurosci.* 22, 1679–1689. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-05-01679.2002>

168. S., K., P., S., Madhusudan, R., Sundaramoorthy, S., Namboori, Dr.K., 2019. Detection of Multi-Class Retinal Diseases Using Artificial Intelligence: An Expeditious Learning Using Deep CNN with Minimal Data. *Biomedical & Pharmacology Journal* 12, 1577–1586. <https://doi.org/10.13005/bpj/1788>

169. Saadane, A., Mast, N., Charvet, C.D., Omarova, S., Zheng, W., Huang, S.S., Kern, T.S., Peachey, N.S., Pikuleva, I.A., 2014. Retinal and Nonocular Abnormalities in Cyp27a1<sup>-/-</sup>-Cyp46a1<sup>-/-</sup> Mice with Dysfunctional Metabolism of Cholesterol. *The American Journal of Pathology* 184, 2403–2419. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2014.05.024>

170. Saccà, S.C., Cutolo, C.A., Ferrari, D., Corazza, P., Traverso, C.E., 2018. The Eye, Oxidative Damage and Polyunsaturated Fatty Acids. *Nutrients* 10, 668. <https://doi.org/10.3390/nu10060668>  
Saadane, A., Mast, N., Charvet, C.D., Omarova, S., Zheng, W., Huang, S.S., Kern, T.S., Peachey, N.S., Pikuleva, I.A., 2014. Retinal and nonocular abnormalities in Cyp27a1<sup>(-/-)</sup>Cyp46a1<sup>(-/-)</sup> mice with dysfunctional metabolism of cholesterol. *Am J Pathol* 184, 2403–2419. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2014.05.024>

171. Saito, S., Tanaka, M., Satoh-Asahara, N., Carare, R.O., Ihara, M., 2021. Taxifolin: A Potential Therapeutic Agent for Cerebral Amyloid Angiopathy. *Front. Pharmacol.* 12. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.643357>

172. Salas-Estrada, A. L., Leslie, A., 2018. Study of Rhodopsin's Conformational Equilibrium and Activation Dynamics Using Multi-Scale Molecular Dynamics Simulations.

173. Salchi, H., 2022. Aging eyesight issues and treatment. Baylor college of Medicine.

174. Sancho-Pelluz, J., Arango-Gonzalez, B., Kustermann, S., Romero, F.J., van Veen, T., Zrenner, E., Ekström, P., Paquet-Durand, F., 2008. Photoreceptor cell death mechanisms in inherited retinal degeneration. *Mol Neurobiol* 38, 253–269. <https://doi.org/10.1007/s12035-008-8045-9>

175. SanGiovanni, J.P., Chew, E.Y., 2005. The role of omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in health and disease of the retina. *Prog Retin Eye Res* 24, 87–138. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2004.06.002>

176. Sapienza, P., Chen, J., Stahl, A., Seaward, M.R., Favazza, T.L., Juan, A.M., Hatton, C.J., Joyal, J.-S., Krahn, N.M., Dennison, R.J., Tang, J., Kern, T.S., Akula, J.D., Smith, L.E.H.,

2012. Omega-3 polyunsaturated fatty acids preserve retinal function in type 2 diabetic mice. *Nutr & Diabetes* 2, e36–e36. <https://doi.org/10.1038/nutd.2012.10>
177. says, M.C., 2020. Higher doses of omega-3 supplements may be needed for averting cognitive decline [WWW Document]. *News-Medical*. URL <https://www.news-medical.net/news/20200719/Higher-doses-of-omega-3-supplements-may-be-needed-for-averting-cognitive-decline.aspx> (accessed 7.27.24).
178. Scott, B.L., Bazan, N.G., 1989. Membrane docosahexaenoate is supplied to the developing brain and retina by the liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 2903–2907. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.8.2903>
179. Shetty, M.S., Sharma, M., Hui, N.S., Dasgupta, A., Gopinadhan, S., Sajikumar, S., 2015. Investigation of Synaptic Tagging/Capture and Cross-capture using Acute Hippocampal Slices from Rodents. *J Vis Exp* 53008. <https://doi.org/10.3791/53008>
180. Shi, J., Sabbagh, M.N., Vellas, B., 2020. Alzheimer’s disease beyond amyloid: strategies for future therapeutic interventions. *BMJ* 371, m3684. <https://doi.org/10.1136/bmj.m3684>
181. Shi, H., Koronyo, Y., Rentsendorj, A., Fuchs, D.-T., Sheyn, J., Black, K.L., Mirzaei, N., Koronyo-Hamaoui, M., 2021. Retinal Vasculopathy in Alzheimer’s Disease. *Front Neurosci* 15, 731614. <https://doi.org/10.3389/fnins.2021.731614>
182. Si, Z., Zheng, Y., Zhao, J., 2023. The Role of Retinal Pigment Epithelial Cells in Age-Related Macular Degeneration: Phagocytosis and Autophagy. *Biomolecules* 13, 901. <https://doi.org/10.3390/biom13060901>
183. Silver, D.L., Wang, N., Tall, A.R., 2000. Defective HDL particle uptake in ob/ob hepatocytes causes decreased recycling, degradation, and selective lipid uptake. *J Clin Invest* 105, 151–159. <https://doi.org/10.1172/JCI8087>
184. Silverstein, S.M., Rosen, R., 2015. Schizophrenia and the eye. *Schizophr Res Cogn* 2, 46–55. <https://doi.org/10.1016/j.scog.2015.03.004>
185. Simon, M., Wang, M.X., Ismail, O., Braun, M., Schindler, A.G., Reemmer, J., Wang, Z., Haveliwala, M.A., O’Boyle, R.P., Han, W.Y., Roese, N., Grafe, M., Woltjer, R., Boison, D., Iliff, J.J., 2022. Loss of perivascular aquaporin-4 localization impairs glymphatic exchange and promotes amyloid  $\beta$  plaque formation in mice. *Alzheimers Res Ther* 14, 59. <https://doi.org/10.1186/s13195-022-00999-5>
186. Sivak, J.M., 2013. The aging eye: common degenerative mechanisms between the Alzheimer’s brain and retinal disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 54, 871–880. <https://doi.org/10.1167/iovs.12-10827>
187. Smith, A.J., Duan, T., Verkman, A.S., 2019. Aquaporin-4 reduces neuropathology in a mouse model of Alzheimer’s disease by remodeling peri-plaque astrocyte structure. *Acta Neuropathol Commun* 7, 74. <https://doi.org/10.1186/s40478-019-0728-0>
188. Sugasini, D., Park, J.C., McAnany, J.J., Kim, T.-H., Ma, G., Yao, X., Antharavally, B., Oroskar, A., Oroskar, A.A., Layden, B.T., Subbaiah, P.V., 2023. Improvement of retinal function in Alzheimer disease-associated retinopathy by dietary lysophosphatidylcholine-EPA/DHA. *Sci Rep* 13, 9179. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-36268-0>

189. Strauss, O., 2005. The Retinal Pigment Epithelium in Visual Function. *Physiological Reviews* 85, 845–881. <https://doi.org/10.1152/physrev.00021.2004>
190. Tachikawa, M., Akanuma, S.-I., Imai, T., Okayasu, S., Tomohiro, T., Hatanaka, Y., Hosoya, K.-I., 2018. Multiple Cellular Transport and Binding Processes of Unesterified Docosahexaenoic Acid in Outer Blood-Retinal Barrier Retinal Pigment Epithelial Cells. *Biol Pharm Bull* 41, 1384–1392. <https://doi.org/10.1248/bpb.b18-00185>
191. Tanzi, R.E., 2012. The genetics of Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2, a006296. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006296>
192. Taveau, N., Cubizolle, A., Guillou, L., Piquier, N., Moine, E., Cia, D., Kalatzis, V., Vercauteren, J., Durand, T., Crauste, C., Brabet, P., 2020. Preclinical pharmacology of a lipophenol in a mouse model of light-induced retinopathy. *Exp Mol Med* 52, 1090–1101. <https://doi.org/10.1038/s12276-020-0460-7>
193. Trenholm, S., Awatramani, G.B., 2015. Origins of spontaneous activity in the degenerating retina. *Front. Cell. Neurosci.* 9. <https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00277>
194. Tserentsoodol, N., Gordiyenko, N.V., Pascual, I., Lee, J.W., Fliesler, S.J., Rodriguez, R., n.d. Intraretinal lipid transport is dependent on high density lipoprotein-like particles and class B scavenger receptors. *Molecular Vision*.
195. Tsin, A., Betts-Obregon, B., Grigsby, J., 2018. Visual cycle proteins: Structure, function, and roles in human retinal disease. *J Biol Chem* 293, 13016–13021. <https://doi.org/10.1074/jbc.AW118.003228>
196. Valenza, M., Facchinetti, R., Sterado, L., Scuderi, C., Altered Waste Disposal System in Aging and Alzheimer’s Disease: Focus on Astrocytic Aquaporin-4. *Front Pharmacol*.
197. Vandebroek, A., Yasui, M., 2020. Regulation of AQP4 in the Central Nervous System. *Int J Mol Sci* 21, 1603. <https://doi.org/10.3390/ijms21051603>
198. van Kuijk, F.J., 1991. Effects of ultraviolet light on the eye: role of protective glasses. *Environ Health Perspect* 96, 177–184.
199. Varma, V.R., Büşra Lüleci, H., Oommen, A.M., Varma, S., Blackshear, C.T., Griswold, M.E., An, Y., Roberts, J.A., O’Brien, R., Pletnikova, O., Troncoso, J.C., Bennett, D.A., Çakır, T., Legido-Quigley, C., Thambisetty, M., 2021. Abnormal brain cholesterol homeostasis in Alzheimer’s disease—a targeted metabolomic and transcriptomic study. *npj Aging Mech Dis* 7, 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41514-021-00064-9>
200. Vidal, E., Lalarme, E., Maire, M.-A., Febvret, V., Grégoire, S., Gambert, S., Acar, N., Bretillon, L., 2019. Early impairments in the retina of rats fed with high fructose/high fat diet are associated with glucose metabolism deregulation but not dyslipidaemia. *Sci Rep* 9, 5997. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42528-9>
201. Villa, S. A., Tintle, N., Westrea, J., Harris, W. S., 2023. Plasma Omega 3 Fatty Acids and Risk for Incident Dementia in the UK Biobank Study: A Closer Look. *Nutrients*.
202. Vollmer-Snarr, H.R., Pew, M.R., Alvarez, M.L., Cameron, D.J., Chen, Z., Walker, G.L., Price, J.L., Swallow, J.L., 2006. Amino-Retinoid Compounds in the Human Retinal Pigment



Epithelium, in: Hollyfield, J.G., Anderson, R.E., LaVail, M.M. (Eds.), *Retinal Degenerative Diseases*. Springer US, Boston, MA, pp. 69–74. [https://doi.org/10.1007/0-387-32442-9\\_11](https://doi.org/10.1007/0-387-32442-9_11)

203. Yan, L., Xie, Y., Satyanarayanan, S.K., Zeng, H., Liu, Q., Huang, M., Ma, Y., Wan, J.-B., Yao, X., Su, K.-P., Su, H., 2020. Omega-3 polyunsaturated fatty acids promote brain-to-blood clearance of  $\beta$ -Amyloid in a mouse model with Alzheimer's disease. *Brain Behav Immun* 85, 35–45. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2019.05.033>

204. Yang, Y., Xiong, X., Liu, J., Wu, L., Zhong, Q., Zhou, K., Meng, Z., Liu, L., Wang, F., Gong, Q., Liao, M., Duan, C., Li, J., Yang, M., Zhang, Q., Gong, C., Yang, Q., 2017. Mfsd2a (Major Facilitator Superfamily Domain Containing 2a) Attenuates Intracerebral Hemorrhage-Induced Blood-Brain Barrier Disruption by Inhibiting Vesicular Transcytosis. *JAHA* 6, e005811. <https://doi.org/10.1161/JAHA.117.005811>

205. Yip, C.M., Elton, E.A., Darabie, A.A., Morrison, M.R., McLaurin, J., 2001. Cholesterol, a modulator of membrane-associated  $\alpha\beta$ -fibrillogenesis and neurotoxicity<sup>1</sup>. *Journal of Molecular Biology* 311, 723–734. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2001.4881>

206. Yu, X., Zheng, J., 2012. Cholesterol Promotes the Interaction of Alzheimer  $\beta$ -Amyloid Monomer with Lipid Bilayer. *Journal of Molecular Biology* 421, 561–571. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2011.11.006>

207. Wang, Z., Liu, C.-H., Huang, S., Fu, Z., Tomita, Y., Britton, W.R., Cho, S.S., Chen, C.T., Sun, Y., Ma, J.-X., He, X., Chen, J., 2020. Wnt signaling activates MFSD2A to suppress vascular endothelial transcytosis and maintain blood-retinal barrier. *Sci Adv* 6, eaba7457. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aba7457>

208. Wang, H., Kulas, J.A., Wang, C., Holtzman, D.M., Ferris, H.A., Hansen, S.B., 2021. Regulation of beta-amyloid production in neurons by astrocyte-derived cholesterol. *Proc Natl Acad Sci U S A* 118, e2102191118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2102191118>

209. Weller, R.O., Nicoll, J.A.R., 2005. Cerebral amyloid angiopathy: Both viper and maggot in the brain. *Annals of Neurology* 58, 348–350. <https://doi.org/10.1002/ana.20622>

210. Williams, T.L., Serpell, L.C., 2011. Membrane and surface interactions of Alzheimer's A $\beta$  peptide--insights into the mechanism of cytotoxicity. *FEBS J* 278, 3905–3917. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08228.x>Winkler i sar., 2015

211. Wolters, W.J., Duncan, H.F., Tomson, P.L., Karim, I.E., McKenna, G., Dorri, M., Stangvaltaite, L., van der Sluis, L.W.M., 2017. Minimally invasive endodontics: a new diagnostic system for assessing pulpitis and subsequent treatment needs. *Int Endod J* 50, 825–829. <https://doi.org/10.1111/iej.12793>

212. Wong, B.H., Chan, J.P., Cazenave-Gassiot, A., Poh, R.W., Foo, J.C., Galam, D.L., Ghosh, S., Nguyen, L.N., Barathi, V.A., Yeo, S.W., Luu, C.D., Wenk, M.R., Silver, D.L., 2016. Mfsd2a Is a Transporter for the Essential omega-3 Fatty Acid Docosahexaenoic Acid (DHA) in Eye and Is Important for Photoreceptor Cell Development. *Elements*.

213. Wong, B.H., Silver, D.L., 2020. Mfsd2a: A Physiologically Important Lysolipid Transporter in the Brain and Eye. *Adv Exp Med Biol* 1276, 223–234. [https://doi.org/10.1007/978-981-15-6082-8\\_14](https://doi.org/10.1007/978-981-15-6082-8_14)

214. Wong, L.-W., Chong, Y.S., Lin, W., Kisiswa, L., Sim, E., Ibáñez, C.F., Sajikumar, S., 2021. Age-related changes in hippocampal-dependent synaptic plasticity and memory mediated by p75 neurotrophin receptor. *Aging Cell* 20, e13305. <https://doi.org/10.1111/acel.13305>
215. Wu, D., Chen, Q., Chen, X., Han, F., Chen, Z., Wang, Y., 2023. The blood–brain barrier: structure, regulation, and drug delivery. *Sig Transduct Target Ther* 8, 1–27. <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01481-w>
216. Xia, D., Lianoglou, S., Sandmann, T., Calvert, M., Suh, J.H., Thomsen, E., Dugas, J., Pizzo, M.E., DeVos, S.L., Earr, T.K., Lin, C.-C., Davis, S., Ha, C., Leung, A.W.-S., Nguyen, H., Chau, R., Yulyaningsih, E., Lopez, I., Solanoy, H., Masoud, S.T., Liang, C.-C., Lin, K., Astarita, G., Khoury, N., Zuchero, J.Y., Thorne, R.G., Shen, K., Miller, S., Palop, J.J., Garceau, D., Sasner, M.,
217. Xie, L., Kang, H., Xu, Q., Chen, M.J., Liao, Y., Thiyagarajan, M., O'Donnell, J., Christensen, D.J., Nicholson, C., Iliff, J.J., Takano, T., Deane, R., Nedergaard, M., 2013. Sleep drives metabolite clearance from the adult brain. *Science* 342, 373–377. <https://doi.org/10.1126/science.1241224>
218. Xiong, H., Callaghan, D., Jones, A., Walker, D.G., Lue, L.-F., Beach, T.G., Sue, L.I., Woulfe, J., Xu, H., Stanimirovic, D.B., Zhang, W., 2008. Cholesterol retention in Alzheimer's brain is responsible for high  $\beta$ - and  $\gamma$ -secretase activities and A $\beta$  production. *Neurobiol Dis* 29, 422–437. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2007.10.005>
219. Xiong, L., Boulouis, G., Charidimou, A., Roongpiboonsopit, D., Jessel, M.J., Pasi, M., Reijmer, Y.D., Fotiadis, P., Ayres, A., Merrill, E., Schwab, K., Blacker, D., Gurol, M.E., Greenberg, S.M., Viswanathan, A., 2018. Dementia incidence and predictors in cerebral amyloid angiopathy patients without intracerebral hemorrhage. *J Cereb Blood Flow Metab* 38, 241–249. <https://doi.org/10.1177/0271678X17700435>
220. Xu, Z., Xiao, N., Chen, Y., Huang, H., Marshall, C., Gao, J., Cai, Z., Wu, T., Hu, G., Xiao, M., 2015. Deletion of aquaporin-4 in APP/PS1 mice exacerbates brain A $\beta$  accumulation and memory deficits. *Mol Neurodegener* 10, 58. <https://doi.org/10.1186/s13024-015-0056-1>
221. Young, R.W., 1967. THE RENEWAL OF PHOTORECEPTOR CELL OUTER SEGMENTS. *Journal of Cell Biology* 33, 61–72. <https://doi.org/10.1083/jcb.33.1.61>
222. Zähringer, U., Lindner, B., Rietschel, E.T., 1999. Chemical Structure of Lipid A: Recent Advances in Structural Analysis of Biologically Active Molecules, in: *Endotoxin in Health and Disease*. CRC Press.
223. Zeppenfeld, D.M., Simon, M., Haswell, J.D., D'Abreo, D., Murchison, C., Quinn, J.F., Grafe, M.R., Woltjer, R.L., Kaye, J., Iliff, J.J., 2017. Association of Perivascular Localization of Aquaporin-4 With Cognition and Alzheimer Disease in Aging Brains. *JAMA Neurology* 74, 91–99. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2016.4370>
224. Zhang, F., Gannon, M., Chen, Y., Yan, S., Zhang, S., Feng, W., Tao, J., Sha, B., Liu, Z., Saito, T., Saido, T., Keene, C.D., Jiao, K., Roberson, E.D., Xu, H., Wang, Q., 2020.  $\beta$ -amyloid redirects norepinephrine signaling to activate the pathogenic GSK3 $\beta$ /tau cascade. *Sci Transl Med* 12, eaay6931. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aay6931>

225. Zhang, M., Zhong, L., Han, X., Xiong, G., Xu, D., Zhang, S., Cheng, H., Chiu, K., Xu, Y., 2021. Brain and Retinal Abnormalities in the 5XFAD Mouse Model of Alzheimer's Disease at Early Stages. *Front. Neurosci.* 15. <https://doi.org/10.3389/fnins.2021.681831>
226. Zhang, W.-B., Huang, Y., Guo, X.-R., Zhang, M.-Q., Yuan, X.-S., Zu, H.-B., 2023. DHCR24 reverses Alzheimer's disease-related pathology and cognitive impairment via increasing hippocampal cholesterol levels in 5XFAD mice. *Acta Neuropathol Commun* 11, 102. <https://doi.org/10.1186/s40478-023-01593-y>
227. Zhao, Z., Zlokovic, B.V., 2014. Blood-brain barrier: a dual life of MFSD2A? *Neuron* 82, 728–730. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.05.012>
228. Zhao, X., Zhang, S., Sanders, A.R., Duan, J., 2023. Brain Lipids and Lipid Droplet Dysregulation in Alzheimer's Disease and Neuropsychiatric Disorders. *Complex Psychiatry* 9, 154–171. <https://doi.org/10.1159/000535131>
229. Zheng, W., Mast, N., Saadane, A., Pikuleva, I.A., 2015. Pathways of cholesterol homeostasis in mouse retina responsive to dietary and pharmacologic treatments[S]. *Journal of Lipid Research* 56, 81–97. <https://doi.org/10.1194/jlr.M053439>
230. Zheng, W., Reem, R.E., Omarova, S., Huang, S., DiPatre, P.L., Charvet, C.D., Curcio, C.A., Pikuleva, I.A., 2012. Spatial distribution of the pathways of cholesterol homeostasis in human retina. *PLoS One* 7, e37926. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037926>
231. Zhuo, S., Zhao, Z., Xie, Z., Hao, Y., Xu, Y., Zhao, T., Li, H., Knubben, E.M., Wen, L., Jiang, L., Liu, M., 2020. Complex multiphase organohydrogels with programmable mechanics toward adaptive soft-matter machines. *Sci Adv* 6, eaax1464. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aax1464>
232. Zlokovic, B.V., Deane, R., Sagare, A.P., Bell, R.D., Winkler, E.A., 2010. Low-density lipoprotein receptor-related protein-1: a serial clearance homeostatic mechanism controlling Alzheimer's amyloid  $\beta$ -peptide elimination from the brain. *Journal of Neurochemistry* 115, 1077–1089. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2010.07002.x>

## BIOGRAFIJA AUTORA

Irena I. Jovanović Macura je rođena 24. oktobra 1988. godine u Beogradu, gde je završila osnovnu i srednju školu. Osnovne studije je upisala 2007. na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu (UB), modul Molekularna biologija i fiziologija, i završila ih je 2010. godine, kada upisuje master akademske studije, koje završava 2013., sa prosečnom ocenom 9,2. Doktorske akademske studije upisuje 2016. godine na Biološkom fakultetu UB, modul Eksperimentalna Neurobiologija, gde polaže sve ipite sa prosečnom ocenom 9,63. Iste godine se zapošljava na Institutu za Biološka istraživanja „Siniša Stanković”, Institutu od Nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, na Odeljenju za Neurobiologiju, na projektu „Plastičnost mozga tokom starenja: uticaj dijetalne restrikcije i anestezije”, finansiranog od strane Ministarstva nauke, tehnološkog razvoja i inovacija republike Srbije. Zvanje istraživač pripravnik je stekla u januaru 2017. godine, a istraživač saradnik u februaru 2020. godine. Aktivni je član Društva za Neuronauke Srbije i Federacije evropskih društava za neuronauke (eng. *Federation of European Neuroscience Societies*). Do sada je objavila 6 radova u međunarodnim časopisima i imala više saopštenja na međunarodnim i domaćim skupovima.

# Изјава о ауторству

Потписани-а Ирена Јовановић Мацура

број индекса Б3035/2016

## Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Утицај суплементације рибљим уљем на метаболизам холестерола у мрежњачи миша током физиолошког старења и у моделу Алцхајмерове болести

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

**Потпис докторанда**

У Београду, 23. 8. 2024.

---

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Ирена Јовановић Мацура

Број индекса Б3035/2016

Студијски програм Биологија

Утицај суплементације рибљим уљем на метаболизам холестерола у мрежњачи миша током физиолошког старења и у моделу Алцхајмерове болести

Ментор др Сања Ивковић, др Надежда Недељковић

Потписани/а Ирена Јовановић Мацура

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

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

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

**Потпис докторанда**

У Београду, 23. 8. 2024.

## Изјава о коришћењу

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

Утицај суплементације рибљим уљем на метаболизам холестерола у мрежњачи миша током физиолошког старења и у моделу Алцхајмерове болести

која је моје ауторско дело.

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

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

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство - некомерцијално - без прераде
4. Ауторство - некомерцијално - делити под истим условима
5. Ауторство - без прераде
6. Ауторство - делити под истим условима

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

**Потпис докторанда**

У Београду, 23. 8. 2024.

---

1. **Ауторство** - Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. **Ауторство - некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. **Ауторство - некомерцијално - без прераде.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. **Ауторство - некомерцијално - делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. **Ауторство - без прераде.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. **Ауторство - делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.