

Jméno autora: MUDr. Martina Zvěřová, Ph.D.

Název pracoviště: Psychiatrická klinika 1. Lékařské fakulty Univerzity Karlovy a VFN Praha

Název práce: Potenciální plazmatické biomarkery Alzheimerovy choroby

Rozsah práce a dokumentace:

Práce má 122 stran a upoutá ihned svou šíří záběru. Je přehledně rozdělena do šestnácti kapitol. Následuje přesný seznam použité literatury, uvedených zkratk a vybraných publikací.

Zpracování tématu s ohledem na dosavadní stav dané problematiky:

Práce byla vytvořena na základě dlouhodobé výzkumné práce autorky. Vychází z širokého teoretického podkladu a z vlastních vědeckých výsledků, které vznikly částečně v rámci programových projektů MZ ČR s reg. č. 15-28967A, Výzkumným záměrem MSM 0021620849, projektem MZ ČR – RVO - VFN64165 a projektem UK PRVOUK-P26/LF1/4, grant GA ČR č. 17-05292S a výzkumným záměrem UK PROGRES Q27/LF.

Výzkumný záměr:

- měření změn klinických, biochemických a genetických parametrů u osob s Alzheimerovou nemocí proti souboru kontrolních zdravých osob
- analýza spojení těchto parametrů s rizikem vzniku onemocnění
- testování hypotézy existence významné asociace Alzheimerovy nemoci s různými genetickými polymorfismy a biochemickými parametry měřitelnými v periferní krvi

Teoretická část:

Prvních jedenáct částí (str. 6-42) se podrobně věnuje studovanému onemocnění.

Autorka se zde nejdříve zabývá historií a epidemiologií Alzheimerovy nemoci, uvádí také aktuální situaci v České republice a rizikové faktory vzniku choroby. Definuje syndrom demence, rozdělení demencí podle etiologie, lokalizace a její kurability. Dále se věnuje otázkám neuropatologie a patofyziologie choroby a její etiopatogenezi. Zabývá se diagnostikou a diferenciální diagnostikou choroby, vylučovacími kritérii, klinickými aspekty a terapií onemocnění (farmakologickou a nefarmakologickou). Podrobně popisuje také mírnou kognitivní poruchu, která může přerůst v demenci. Popisuje rizikové faktory této konverze, tj. přítomnost „rizikových biomarkerů“ v mozkomíšním moku.

Ve 12. části (na str. 43-47) je uveden přehled publikovaných nových výzkumných zjištění.

Autorka uvádí, že k časně diagnostice Alzheimerovy nemoci a k sledování účinnosti její léčby dosud chybí dostatečně citlivé a selektivní testy (genetické, biochemické, fyziologické, neuroendokrinní či jiné biologické).

Dále rozvíjí hypotézy vzniku nemoci (hypotéza amyloidová, tau proteinová, mitochondriální, cholesterolová, genetická, infekční, metabolická, zánětlivá, toxická, hypotéza vycházející z mikrokrevání v mozku, střevního mikrobiomu, poruchy dendritů, poruchy regulace pomocí nekódujících RNA a MAPK (tj.mitogen activated protein kinase) teorie).

Vlastní výzkumná práce:

Vlastní habilitační téma je zpracováno ve 13. části (str. 47-53), kde se autorka zabývá biomarkery obecně, biomarkery v psychiatrii a biomarkery u Alzheimerovy demence.

Další 14. kapitola (str. 53-59) je zaměřena na známé fluidní biomarkery neurodegenerativních změn v mozku a možnostem jejich využití.

Jsou zde definovány biomarkery, jejich vlastnosti a přínos. Dostáváme se postupně k potenciálním plazmatickým biomarkerům, jejichž stanovování je ve srovnání s likvorovými biomarkery pro pacienta nezatěžující, pro lékaře finančně méně náročné, dostupné a dostatečně informativní.

Mezi biomarkery Alzheimerovy demence patří zobrazování amyloidových plaků in vivo pomocí PET a MRI vyšetření mozku, dále biomarkery získané biochemickým vyšetřením mozkomíšního moku a v neposlední řadě, což je předmětem habilitační práce, vyšetřením periferní krve.

V15. kapitole (str. 59-104) jsou uvedeny autorčiny publikované práce a jejich souhrn k vlastnímu výzkumu.

V sedmi podkapitolách jsou uvedeny informace z publikovaných prací, kde je MUDr. M. Zvěřová, Ph.D. hlavní autorkou, příp. spoluautorkou. Jedná se o články z let 2013-2018 v renomovaných a vysoce hodnocených časopisech, jejichž uveřejnění předchází přísný výběr dodaných článků. Její práce vykazují kvalitu a originalitu. Některé z publikovaných článků byly vysoce oceněny v ČR (Národní psychiatrická cena prof. Vladimíra Vondráčka za rok 2014, Cena ČNPS za rok 2014, 1. místo za odbornou klinickou práci v oblasti psychofarmakologie).

Publikované práce jsou přesně a výstižně formulovány, podrobně statisticky zpracovány a informace jsou přehledně podány v textu, grafech i tabulkách. Teoretické předpoklady jsou pečlivě propracovány, zkoumané soubory detailně zmapovány, metodiky dokonale popsány a zjištěné výsledky se vzájemně propojují a souvisejí. Práce tak významně obohacují současné znalosti o Alzheimerově

chorobě. Autorka je již respektovanou odbornicí, což potvrzuje celou svou výzkumnou prací.

Osmá podkapitola (str. 92-103) je nazvána Biologické markery Alzheimerovy choroby – vlastní výsledky z řešení výzkumného záměru – souhrn (Zvěřová M., Fišar Z., Jiráček R., Kitzlerová E., Hroudová J., Hansíková H., Spáčilová J., Pláteník J., Buchal R., Lelková P., Benáková H., Martásek P., Zeman J., Raboch J.). Zde je dr. Zvěřová hlavní řešitelkou výzkumného úkolu.

Autorka ve své výzkumné práci stanovuje ve skupině osob s Alzheimerovou nemocí a zdravých osob kontrolní skupiny potenciální biomarkery v periferní krvi. Těmi jsou:

- koncentrace homocysteinu, kortizolu, prolaktinu, melatoninu, neurotrofinu BDNF (brain derived neurotrophic factor) a koenzymu Q10 (v plazmě)
- koncentrace mozkového BDNF a aktivita monoaminoxidázy typu B (MAO B), citrát-syntázy, komplexů I, II a IV mitochondriálního dýchacího řetězce a glykogensyntázykinázy-3 β (GSK3 β) (v trombocytech)
- aktivita transkripčního faktoru CREB (v lymfocytech)
- respirační rychlost mitochondrií (v trombocytech)
- polymorfismy genů pro apolipoprotein E (APOE), serotoninový transportér (5-HTT), BDNF, serotoninový receptor 2A (5-HT2A) a proteiny tepelného šoku (HSP70)

Byla analyzována asociace těchto parametrů s rizikem vzniku Alzheimerovy nemoci a progresí onemocnění. Dále byla testována hypotéza, že existuje významná asociace Alzheimerovy nemoci s různými genetickými polymorfismy a biochemickými parametry měřitelnými v periferní krvi.

Vyšetřování byli pacienti s klinicky potvrzenou diagnózou Alzheimerovy nemoci (86 osob). Všichni byli starší 50 let, netrpěli žádným závažnějším somatickým onemocněním a byla u nich vyloučena symptomatická demence. Kontrolní skupina (47 osob) byla tvořena osobami staršími 50 let bez demence, bez duševní poruchy a bez organického poškození mozku. Jedna podskupina byla složena z osob s Alzheimerovou nemocí a depresí jako komorbiditou.

Biochemické a genetické parametry byly měřeny v plazmě, trombocytech a lymfocytech izolovaných ze vzorků nesrážlivé periferní krve.

Výsledky autorka rozděluje do jednotlivých parametrů, a to mitochondriálních, krevních, polymorfismu genů, genetiky a krevní plasmy, lymfocytů a trombocytů.

Ve skupině nemocných Alzheimerovou chorobou byly zjištěny tyto statisticky významné rozdíly proti kontrolní skupině v jednotlivých sledovaných parametrech.

Mitochondriální parametry:

- snížení aktivity citrát syntázy a komplexu IV dýchacího řetězce
- snížení respirační rychlosti mitochondrií v intaktních krevních destičkách
- menší snížení respirační rychlosti mitochondrií po inhibici komplexu I

Krevní parametry:

- zvýšení plazmatické koncentrace homocysteinu, kortizolu a prolaktinu
- zvýšení aktivity CREB

Polymorfismy genů:

- v jaderné DNA byly detekovány polymorfismy genů pro APOE, 5-HTTT, BDNF, 5-HT2A a HSP70
- zvýšení frekvence alelyε4 genu pro ApoE
- riziko vzniku nemoci bylo zvýšeno při testování kombinace genotypů pro ApoE, 5-HTT a HSP70

Při porovnání skupiny nemocných Alzheimerovou chorobou a skupinou zdravých osob vzniká na základě logistické regrese model, podle něhož je pravděpodobnost výskytu nemoci nejvíce spojena s tímto parametrem: genotyp APOE obsahuje aleluε4 a současně neobsahuje aleluε2.

V mitochondriálních parametrech dává logistická regrese model, podle něhož je pravděpodobnost výskytu Alzheimerovy choroby nejvíce spojena se sníženou aktivitou citrát syntázy a poklesem aktivity komplexu IV a vzestupem aktivity komplexu II.

Pravděpodobnost výskytu Alzheimerovy choroby je nejvíce spojena s poklesem koncentrace koenzymu Q10, sníženou maximální kapacitou mitochondriální respirace a s menším snížením respirační rychlosti mitochondrií po inhibici komplexu I.

V plazmatických údajích se prokazuje souvislost zvýšené pravděpodobnosti výskytu Alzheimerovy choroby se zvýšenou koncentrací homocysteinu a kortizolu, a se sníženou koncentrací melatoninu.

V každé části souhrnných výsledků jsou uvedeny údaje pro nemocné Alzheimerovou nemocí s depresivními příznaky.

Souhrnná analýza tedy popisuje zvýšenou pravděpodobnost výskytu Alzheimerovy nemoci při těchto nálezech:

- snížení aktivity komplexu IV dýchacího řetězce
- snížení fyziologické respirační rychlosti mitochondrií v intaktních krevních destičkách
- zvýšená plazmatická koncentrace homocysteinu
- výskyt genotypu 4/4 nebo 4/3 polymorfismů genu APOE pro ApoE.

Pokud nebyly analyzovány parametry mitochondriální respirace (které byly měřeny jen u části účastníků studie), vznikl na základě logistické regrese model, podle něhož je pravděpodobnost výskytu nemoci nejvíce spojena s těmito nálezy:

- snížená aktivita komplexu IV dýchacího řetězce
- zvýšená aktivita komplexu II
- zvýšená plazmatická koncentrace homocysteinu
- snížená plazmatická koncentrace melatoninu
- výskyt genotypu L/L polymorfismu LPR genu SLC6A4 pro 5-HTT
- výskyt genotypu 4/4 nebo 4/3 polymorfismů genu APOE pro apolipoprotein E

Závěr:

V závěrečném textu v 16. kapitole (str. 104-105) shrnuje dr. Zvěřová znalosti o Alzheimerově nemoci a výsledky z řešení výzkumného záměru.

Autorka uvádí, že etiologie a etiopatogeneze Alzheimerovy nemoci není dosud známá. Riziko jejího vzniku je spojováno s řadou biochemických parametrů a genetických variant.

Uvádí dále hypotézy vzniku Alzheimerovy nemoci, a to cholinergní (snížená syntéza acetylcholinu), amyloidovou (abnormální akumulace amyloidu-beta) a tau-proteinovou (patologická agregace tau-proteinu).

Popisuje další možné etiologických faktory, tj. mechanismy vedoucí k poškození neuroplasticity a neurogeneze, indukci apoptózy, poruchy v buněčné energetice a mitochondriálních dysfunkcích.

Zmiňuje dále podíl genetické variability na vzniku a progresi nemoci.

Vlastní vědecká práce se věnuje identifikací potenciálních biomarkerů v periferní krvi, určených pro diagnostiku a sledování progresu onemocnění.

Na základě vlastních provedených plazmatických vyšetření se prokazuje, že k pravděpodobnosti výskytu Alzheimerovy demence přispívá ze sledovaných biomarkerů nejvíce zvýšená plazmatická koncentrace homocysteinu a kortizolu (která stoupá s tíží onemocnění).

Tyto parametry mohou být součástí souboru biomarkerů a/nebo indikátory závažnosti mozkového poškození.

Do panelu možných biomarkerů Alzheimerovy nemoci pro sledování rizika vzniku onemocnění a jeho průběhu lze zařadit na základě výzkumu tyto parametry:

- zvýšení plazmatické koncentrace prolaktinu
- snížení aktivity citrátsyntázy a komplexu IV mitochondriálního dýchacího řetězce
- zvýšení aktivity komplexu II mitochondriálního dýchacího řetězce
- snížení koncentrace koenzymu Q10
- snížení respirační rychlosti mitochondrií v intaktních destičkách
- zvýšení aktivity CREB v lymfocytech
- snížení koncentrace BDNF v plazmě obohacené destičkami
- zvýšení aktivity GSK-3b v destičkách

Některé z těchto parametrů vykazují souvislost s výskytem depresivních symptomů u Alzheimerovy nemoci.

Kombinací těchto měřených parametrů lze dosáhnout vysoké senzitivity a specificity testu, což jsou vlastnosti důležité pro biomarkery.

Autorka dále předpokládá, že bude nutné studovat obsáhlejší panel vhodných biomarkerů, které jsou dosud zkoumány, neboť při značné polymorbiditě osob ve vyšším věku je obtížnější rozlišit specifické biomarkery Alzheimerovy nemoci od jiných.

Autorka potvrzuje literární údaje, které uvádějí, že riziko vzniku Alzheimerovy nemoci je asociováno především s polymorfismy genu pro APOE, kdy alela $\epsilon 4$ představuje rizikový faktor dané nemoci v genotypch $\epsilon 4/\epsilon 4$ a $\epsilon 3/\epsilon 4$; riziko ke vzniku nemoci zřejmě zvyšují také polymorfismy genů pro HSP70 a 5-HTT.

Na základě vlastních výsledků ukazuje, že ke zvýšenému riziku vzniku sledovaného onemocnění přispěla větší frekvence výskytu genotypu 12/12 polymorfismu VNTR genu pro 5-HTT proti genotypům 10/10 a 12/10, genotypu G/G

polymorfismu +190G/C genu pro HSP70 proti genotypu C/G. Usuzuje proto, že aktivita 5-HTT a HSP70 se může podílet na patofyziologii onemocnění.

Přehledy použité literatury, zkratk a seznam vybraných publikací:

V další 17. části autorka precizně cituje rozsáhlý soubor použité literatury a v 18. části uvádí přehledně použité zkratky. Zajišťuje tak přesné údaje, čímž nemůže dojít k případným nedorozuměním.

Habilitační práce je uzavřena 19. kapitolou se seznamem vlastních vybraných publikací.

Hodnocení:

V předložené práci autorka prokazuje své široké vzdělání, sečtělost, originální prvky, teoretickou průpravu, dlouhodobou soustředěnou výzkumnou práci i klinickou zkušenost. To vše propojuje se schopností plně syntézy uvedených znalostí a vlastní vědeckou činností. Je schopna interpretovat dosažené výsledky a vyvozovat z nich závěry.

Habilitační práce splňuje veškeré formální náležitosti. Její stylistická i jazyková úroveň je vysoká a bezchybná. Práce je logicky postavená, přehledná a čtivá. Má široký záběr a zároveň se dostává do hloubky zkoumaných témat. Vytyčený cíl bez pochyby naprosto splnila. Výsledky práce jsou cenné a zajímavé pro odborníky v teoretickém výzkumu a zároveň pro klinické pracovníky setkávající se denně s danými tématy ve své praxi.

Vyšetření biomarkerů je slibným krokem v porozumění široké problematice sledovaného onemocnění a bude mít jistě v budoucnosti přínos pro klinické psychiatry a neurology. Spolupráce odborníků v těchto oborech je nutností a měla by se stát samozřejmostí každodenní psychiatrické práce, a to zejména zatím alespoň u nemocných s neurodegenerativními onemocněními.

Psychiatrická onemocnění bývají heterogenní a jejich diagnostika je založena na symptomech nikoli příčině. Studováním biomarkerů se můžeme posunout k dalším zcela zásadním poznatkům.

Práci jednoznačně doporučuji přijmout v předložené formě, neboť splňuje požadavky kladené na habilitační práce v oboru psychiatrie.

Vše výše uvedené je předpokladem k její další pedagogické činnosti a doporučuji MUDr. Martině Zvěřové, Ph.D. udělit titul docentky pro obor psychiatrie.

V Příbrami dne 10. května 2019


MUDr. Eva Kadlecová, CSc.