



Neurologická klinika

Neurologická klinika a Centrum klinických
neurověd 1. lékařská fakulta Univerzita
Karlova a Všeobecná fakultní nemocnice
Kateřinská 30, 128 21 Praha 2



VFN PRAHA

UNIVERZITA KARLOVA
3. lékařská fakulta
T. Jizbová, odd. vědy
Ruská 87, Praha 10

DATUM

Věc: Posudek disertační práce

Pro:

UNIVERZITA KARLOVA

3. lékařská fakulta

Téma práce: Cirkadiánní systém v periferních hodinách u neurodegenerativních a afektivních onemocnění a jeho synchronizace v podmínkách stálého světla

obor: Neurovědy

Vedoucí práce: PhDr. Jana Kopřivová, Ph.D

Vypracovala: Mgr. Kamila Weissová

Mgr. Kamila Weissová ve své práci popisuje několik inovativních přístupů ke studiu cirkadiánního rytmu a jeho biomarkerů jak u zdravých dobrovolníků ve specifických podmínkách, u pacientů s počátečními fázemi neurodegenerativních onemocnění, u pacientů s afektivními poruchami, a dokonce post-mortem u pacientů s unipolární depresí (UD) po sebevraždě.

Práce je rozdělena na velmi podrobný a důkladně komentovaný rozbor dostupných literárních údajů o dané problematice, včetně zevrubného popisu molekulárních mechanismů podmiňujících cirkadiánní rytmus obecně a podrobněji u savců, vč. některých biomarkerů, zejména produkce melatoninu. Rovněž je zevrubně popsána interakce vybraných léčiv s cirkadiánním systémem člověka. Dále jsou diskutovány změny cirkadinánních projevů u pacientů s neurodegenerativními onemocněními, zvláště s Alzheimerovou nemocí (AN), poruchou chování v REM spánku (RBD) a Parkinsonovou nemocí (PN).

Vlastní práce se sestává ze 4 experimentů:

1) Porovnání cirkadiánní exprese genů a hladin melatonin u pacient s AN v počátečních fázích v domácím prostředí (kdy kontrolami byli partneři ve stejné domácnosti) a u RBD v prostředí spánkové laboratoře (ve srovnání s nepřibuznými kontrolami). V této části u pacientů s AN byla prokázána zachovaná rytmicita jak hladin melatoninu tak exprese hodinových genů, ale mezi pacienty a kontrolami nebyl signifikantní rozdíl (13 pacientů vs. 13 kontrol). U pacientů s RBD bylo

TELEFON
224 96 5550

IČO
00216208

DIČ
CZ00216208

E-MAIL
david.kemlink@LF1.cuni.cz

prokázáno zpoždění fáze melatoninu a vymizení periodicity *Per2*, *Bmal1* a *Nr1d1*. V této studii byla prováděna i polysomnografie.

2) U dobrovolníků za polárním kruhem byla očekávatelně odlišná aktivita a osvětlení hodnocené pomocí aktigrafie, ve srovnání s podmínkami v ČR (i vzhledem k odlišným pracovním úkolům). Byla mírně snížená hladina melatoninu v nočních hodinách, což odpovídá většímu osvětlení, synchronizace exprese hodinových genů byla zachována, dokonce lépe než v ČR.

3) U pacientů s Bipolární depresí nebyly pozorovány robustní oscilace exprese hodinových genů v suspenzní kultuře transformovaných lymfocytů. U fibroblastových kultur tato oscilace přítomna byla, ale nemohla být hodnocena interakce s Lithiem.

4) Velmi elegantní studie za pomoci hodnocení známého času úmrtí u pacientů s UD při sebevraždě ve kontrolami náhle zemřelými bez UD byl odlišný profil časově oscilující kvantitativní exprese RNA při celotranskriptomovém vyšetření, a to ve smyslu výrazného snížení počtu oscilujících genů u pacientů s UD.

Diskuze a souhrn jsou adekvátně postaveny na získaných výsledcích a reflektují aktuální vědecké poznání. Jsou citovány recentní a relevantní literární zdroje.

Rozsah práce je dostatečný celkem 101 stran vč. literatury – prvních 30 stran obsahuje úvod, dalších 13 popisuje metodiku, výsledky vč. grafů jsou shrnuty na 14 stránkách.

Velmi kompaktní a cílená diskuze je na 4 stranách. Seznam literatury čítá 214 položek.

Předložená práce jednoznačně prokazuje schopnost autorky pracovat podle vědeckých postupů, jak v práci s literaturou, tvorbou hypotéz, přístupu k přípravě i zpracování dat vč. statistické analýzy. Závěry práce adekvátně vycházejí z výsledků pozorování. I publikační aktivita je odpovídající a celkově tak přiložené podklady považuji za adekvátní k přidělení titulu PhD.

Dotazy k obhajobě: 1) Práce je velmi metodologicky pestrá (molekulární biologické metody vč. celotranskriptomových čipů, odběry tkání, práce s buněčnými kulturami, hodnocení aktigrafie) a staticky náročná. Které části prováděla sama autorka a které procesy měl na starost jiný odborník?

2) V úvodu jsou zmiňovány možné konsekvence poruchy synchronizace cirkadiánního rytmu a prostředí a také poruchy synchronizace centrálních a periferních buněčných rytmů na duševní zdraví. Jsou i konkrétní data o vlivu na somatické zdraví, např. u onkologických onemocnění? Jsou dokumentovány pohlavní rozdíly v cirkadiánním rytmu mužů a žen (resp. samic a samců obratlovců)?

3) V prezentované práci je provedeno mnoho podstudií, ale většina pracuje s relativně malým počtem subjektů. Byla provedena analýza statistické síly? Které negativní výsledky je možné považovat za absenci daného fenoménu (resp. platnou nulovou hypotézu), a u kterých se pravděpodobně jedná o problém malého vzorku?

4) Ve studiích s AN byly jako kontroly použity partneři a bylo zmiňováno, že je to výhodou vzhledem k obdobnému vlivu vnějších faktorů. V sekci statistické analýzy je ale uváděno použití jen dvoufaktorové ANOVY s opakováním, nezdá se tedy, že by byla provedena korekce na pohlaví a příslušnost do jednotlivé rodiny. Byl tedy faktor příslušnosti do stejné domácnosti nakonec nějak statisticky zpracována? Přidání více faktorů do statistického modelu sice snižuje jeho sílu, ale přidáním dalších kontrastů může přispět ev. významným výsledkům.

5) Ve studii s RBD byly pozorovány fázové posuny produkce melatoninu a exprese některých hodinových genů. Jak byla prováděna kosinorová analýza – byla aproximována křivka pro každý subjekt a porovnávány parametry těchto křivek, jak to vyplývá z textu, nebo byly vytvořeny křivky pro celou skupinu, jak se to zdá na obrázcích 20 a 21? Není použito omezení periody na 24 hodin pro analýzu omezující, ve smyslu sice snazšího hodnocení fáze, ale dochází pak ke ztrátě

TELEFON
224 96 5550

IČO
00216208

DIČ
CZ00216208

E-MAIL
david.kemlink@LF1.cuni.cz

možnosti detekovat změny délky cyklu (frekvence), který může být u neurodegenerativních onemocnění také hypoteticky možný?

6) Ve studii s pacienty s bipolární afektivní poruchou (BAP) nebyly v lymfoblastoidních liniích nalezeny periodické oscilace exprese hodinových genů, ale úspěšně byly nalezeny v kulturách fibroblastů. Jaký byl zdroj těchto kultur, když v textu je uvedeno, že pacienti s BAP léčení lithiem to nebyli?

7) Existují informace o konkrétní příčině úmrtí u kontrolní skupiny v experimentu s transkriptomem u pac. s UD? Z textu se zdá, že se vždy nejednalo náhlé tragické úmrtí. Jak je možné interpretovat kauzalitu mezi dokonanou sebevraždou při UD a poklesem počtu rytmicky exprimovaných RNA? Je to možná příčina této duševní poruchy, či fenomén značící desynchronizaci v organismu s centrálním nervovým systémem hendikepovaným velmi těžkou duševní poruchou, jistě s významnou poruchou spánku? Je absence rytmické oscilace exprese způsobena spíše snížením amplitudy exprese na úrovni jednotlivců, či větší fázové interindividuální rozdíly ve skupině pacientů s UD?

V Praze, dne 13.8.2020

doc. MUDr. David Kemlink, PhD.



TELEFON
224 96 5550

IČO
00216208

DIČ
CZ00216208

E-MAIL
david.kemlink@LF1.cuni.cz