Univerzita Karlova

Lékařská fakulta v Plzni

Disertační práce

Plzeň 2025 **Radovan KUNC**

Univerzita Karlova

Lékařská fakulta v Plzni

Studijní program: Sociální lékařství

Stárnutí a syndrom demence

a jejich vztah k mitochondriální respiraci trombocytů

Aging and dementia

and their relationship to mitochondrial respiration of platelets

Disertační práce

Školitelka: doc. MUDr. Libuše Čeledová, Ph.D.

Plzeň 2025 **MUDr. Radovan Kunc**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem řádně uvedl a citoval všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Plzni 23.3.2025

Radovan KUNC

Podpis:

Poděkování

Děkuji doc. MUDr. Libuši Čeledové, Ph.D. za ochotu a cenné rady při vedení práce.

Děkuji Mgr. Aleně Böhmové za korektury textu.

Děkuji prof. MUDr. Jitce Kuncové, Ph.D. za odbornou podporu a možnost spolupráce s mitochondriální laboratoří při Ústavu fyziologie.

Finanční podpora:

1. SVV UK 260 538, Patofyziologie a diagnostika neuropatologických a zánětlivých stavů (2020–2022)
2. OP VVV CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_019/0000787, Centrum výzkumu infekčních onemocnění – FIND (2018–2022)
3. Projekt programu UK Progres Q39, Náhrada, podpora a regenerace životně důležitých tkání a orgánů (2017–2021)
4. SVV UK 260 394, Patofyziologie a experimentální terapie zánětlivých a neuropatologických stavů (2018–2019)
5. MŠMT NPU I LO1503, BIOMEDIC (2015–2020)
6. GAUK 966 120, Vliv fyzické námahy na mitochondriální funkce u Alzheimerovy choroby (2020–2022)
7. SVV UK 260 653, Vliv cvičení na funkci mitochondrií a kognitivní poruchy u sepse a schizofrenie (2023)

Abstrakt

Syndrom demence se vyskytuje převážně ve stáří a věk patří mezi nejvýznamnější rizikové faktory jejího vzniku. Nejčastější příčinou demence je Alzheimerova choroba (AD), ale významně jsou zastoupena i další neurodegenerativní onemocnění. Ze sekundárních příčin vyčnívá vaskulární demence. Přes některé pokroky zůstává přesná etiologická diagnostika složitým procesem. Vzhledem k vysoké prevalenci demence tak vzniká logická poptávka po metodách, které by mohly diagnostiku zjednodušit, zrychlit a zpřesnit. Mezi mnoha jinými je zkoumána i možnost využití analýzy mitochondrií dostupných z periferní krve. Na vzniku neurodegenerativních poruch včetně AD se pravděpodobně podílí mitochondriální dysfunkce, která nemusí být omezena na postižené oblasti CNS, ale může se projevit mimo jiné v krevních destičkách a bílých krvinkách. K potvrzení takové teorie je však nezbytné znát vliv zdravého stárnutí na mitochondriální zdatnost krevních elementů.

Naše studie se zaměřila na analýzu prevalence kognitivní dysfunkce u aktivních seniorů nad 70 let pomocí standardních kognitivních testů (primárně MoCA). Následně byla definována kontrolní skupina kognitivně intaktních dobrovolníků bez závažné osobní a farmakologické anamnézy, aby bylo možné porovnat mitochondriální respiraci trombocytů mezi mladšími a staršími jedinci. Dále byla analyzována mitochondriální spotřeba kyslíku v krevních destičkách pacientů s demencí různé etiologie s cílem identifikovat relevantní respirační parametr pro další výzkum. Pandemie Covid-19 však výrazně omezila sběr dat a návaznou diagnostiku u dobrovolníků, jejichž výsledek v MoCA testu implikoval možný kognitivní deficit, což nás přivedlo k doplnění práce o experimenty na transgenních potkanech s modelovým onemocněním AD.

Výsledky ukazují vysokou prevalenci suspektního kognitivního deficitu i mezi aktivními seniory. Potvrdilo se, že mitochondriální respirace trombocytů s věkem klesá, přičemž tento pokles souvisí spíše se stárnutím než s komorbiditami či farmakoterapií. U pacientů s demencí se jako nejslibnější ukázala snížená aktivita respiračního komplexu IV (cytochrom-c-oxidázy). Analýza mitochondriálních funkcí trombocytů se však nejeví jako vhodný diagnostický biomarker AD nebo syndromu demence obecně. Experimenty na transgenních potkanech potvrdily významné postižení mitochondriálních funkcí periferních tkání v souvislosti s AD, což podporuje hypotézu o systémové povaze tohoto onemocnění.

Klíčová slova: stárnutí, kognitivní testování, demence, mitochondrie, trombocyty, biomarker, transgenní potkan TgF344-AD.

Abstract

Dementia syndrome predominantly occurs in old age, with age being one of the most significant risk factors for its development. The most common cause of dementia is Alzheimer's disease (AD); however, other neurodegenerative disorders are also significantly represented. Among secondary causes, vascular dementia stands out. Despite some progress, etiological diagnosis remains a complex process. Prevalence of dementia is high, so there is a logical demand for methods that could simplify, accelerate, and refine diagnostics. Among various approaches, the potential use of mitochondrial analysis from peripheral blood is being explored. Mitochondrial dysfunction is likely involved in the development of neurodegenerative disorders, including AD, and may not be confined to affected CNS regions but could also manifest in blood platelets and white blood cells. However, confirming this theory first requires understanding the effects of healthy aging on mitochondrial fitness in blood components.

Our study focused on analyzing the prevalence of cognitive dysfunction in active seniors over 70 years of age using standard cognitive tests (primarily the MoCA test). Subsequently, we defined a control group of cognitively intact volunteers without significant medical or pharmacological history to compare platelet mitochondrial respiration between younger and older individuals. Furthermore, mitochondrial oxygen consumption in blood platelets of patients with dementia of various etiologies was analyzed to identify a relevant respiratory parameter for further research. However, the COVID-19 pandemic significantly limited data collection and follow-up diagnostics in volunteers whose MoCA test results indicated potential cognitive impairment, leading us to complement the study with experiments on transgenic rats with a model of AD.

The results indicate a high prevalence of suspected cognitive deficit even among active seniors. We confirmed that platelet mitochondrial respiration declines with age. The change was more related to aging than comorbidities or pharmacotherapy. In dementia patients, the most promising finding was reduced activity of respiratory complex IV (cytochrome c oxidase). However, mitochondrial function of thrombocytes does not appear to be a suitable diagnostic biomarker for AD or dementia syndrome in general. Experiments on transgenic rats confirmed significant impairment of mitochondrial function in peripheral tissues associated with AD, supporting the hypothesis of the systemic nature of this disease.

Keywords: aging, cognitive testing, dementia, mitochondria, platelets, biomarker, transgenic rat TgF344-AD.

Obsah

1. Stárnutí a syndrom demence – teoretická část 17

1.1. Stárnutí a demence 17
1.2. Screening kognitivních poruch 20
1.3. Alzheimerova choroba 21
1.3.1. Obecné informace 21
1.3.2. Patofyziologie Alzheimerovy choroby 22
1.3.3. Biomarkery 25
1.4. Demence s Lewyho tělísky 27
1.5. Frontotemporální lobární degenerace 27
1.6. Vaskulární demence 28
1.7. Zvířecí modely Alzheimerovy choroby 29
1.8. Mitochondrie 30
1.8.1. Struktura 30
1.8.2. Mitochondriální funkce 33

2. Stárnutí a syndrom demence – praktická část 38

2.1. Cíle práce 39
2.2. Hypotézy 39
2.3. Metody 40
2.3.1. Metody vztahující se k cíli 1 40
2.3.2. Metody vztahující se k cíli 2 a 3 41
2.3.3. Metody vztahující se k cíli 4 52
2.3.4. Zpracování dat a statistika 55
2.4. Výsledky 57
2.4.1. Výsledky vztahující se k cíli 1 57
2.4.2. Výsledky vztahující se k cíli 2 59
2.4.3. Výsledky vztahující se k cíli 3 63
2.4.4. Výsledky vztahující se k cíli 4 67
2.5. Diskuse 76
2.5.1. Diskuse vztahující se k cíli 1 76
2.5.2. Diskuse vztahující se k cíli 2 79
2.5.3. Diskuse vztahující se k cíli 3 81
2.5.4. Diskuse vztahující se k cíli 4 85
2.6. Závěry a perspektivy 90

3. Literatura 93

4. Přehled publikační činnosti 125

5. Přílohy 127

Seznam zkratek

% glyko	poměr glykolytické k celkové produkci ATP v procentech
αKG	alfa-ketoglutarát
Aβ	beta amyloid
ABCC1	z anglického ATP-binding cassette subfamily C member 1
AD	Alzheimerova choroba, z anglického Alzheimer's disease
ADP, D	adenosindifosfát
ACh	acetylcholin
AmA	antimycin A
APP	amyloidový prekurzorový protein
APPsw	amyloidový prekurzorový protein se švédskou mutací
As	askorbát
ATP	adenosintrifosfát
ATPglyko	rychlost glykolytické produkce
ATPmito	rychlost mitochondriální oxidativní produkce ATP
ATPtot	celková produkce ATP
Azd	azid (sodný)
Bcl2	B-cell lymfoma 2
BIOPS	relaxační a bioptický konzervační roztok
Ca^{2+}	vápenaté kationty
CaK_2EGTA	vápenato-draselná sůl kyseliny ethylenglykol-di-(2-aminoethylether)-tetraoctové
Casp9	kaspáza 9
CCP	cytochrom C peroxidáza
CEREB	cerebellum
CIV	rozpřažená kapacita komplexu IV
CO_2	oxid uhličitý
CoA	koenzym A
COX(5B)	cytochrom C oxidáza (podjednotka 5B)
CRP	C-reaktivní protein
CT	počítačová tomografie, z anglického computed tomography
cyt (c)	cytochrom C
D-loop	z anglického displacement loop
Dig	digitonin
DMEM	z anglického Dulbecco's modified eagle's medium
DLB	demence s Lewyho tělísky, z anglického Dementia with Lewy bodies
Drp1	z anglického dynamin related protein 1
ECAR	rychlost extracelulární acidifikace, z anglického extracellular acidification rate
EGTA	kyselina ethylenglykol-di-(2-aminoethylether)-tetraoctová
EndoG	endonukleáza G
ETS	elektrontransportní systém
ETSC	kapacita elektrontransportního systému
FAD	flavinadenindinukleotid (oxidovaná forma)

$FADH_2$	flavinadenindinukleotid (redukovaná forma)
FAO	oxidace mastných kyselin, z anglického fatty acid oxidation
FCCP	karbonylkyanid-p-trifluorometoxy-fenylhydrazon
FTD, FTLD	frontotemporální demence, frontotemporální lobární degenerace
G	glutamát
GluA2	A2 podjednotka glutamátového receptoru
GTP	guanosintrifosfát
H^+	vodíkový kationt
H_2O	voda
Hb	hemoglobin
HEPES	N-2-hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonová kyselina
HIPO	hipokampus
HRR	vysoce účinná respirometrie, z anglického high-resolution respirometry
I, II, III, IV	respirační komplexy I–IV
IMM	vnitřní mitochondriální membrána, z anglického inner mitochondrial membrane
IMS	mezimembránový prostor, z anglického intermembrane space
K_2EDTA	di-draselná sůl kyseliny etylen-diamin-tetraoctové
K_2EGTA	draselná sůl kyseliny ethylenglykol-di-(2-aminoethylether)-tetraoctové
K_3EDTA	tri-draselná sůl kyseliny etylen-diamin-tetraoctové
KCl	chlorid draselný
KH_2PO_4	dihydrogenfosforečnan draselný
L	stav LEAK
LED	kůra nadledviny
LK	levá komora
LRP1	z anglického low-density lipoprotein receptor-related protein 1
M	malát
MAVS	z anglického mitochondrial antiviral-signaling protein
MCI	mírná kognitivní porucha, z anglického mild cognitive impairment
MCU	mitochondriální vápníkový přenašeč, z anglického mitochondrial calcium uniporter
Mfn1/2	mitofusin 1 a 2
$MgCl_2$	chlorid hořečnatý
MIR05	z anglického mitochondrial respiration medium 05
MoCA	Montrealský kognitivní test, z anglického Montreal Cognitive Assessment
MNM	mitochondriální-neurovaskulární-metabolická (hypotéza)
MPcar	malát a palmitoylkarnitin
MRI	magnetická rezonance, z anglického magnetic resonance imaging
mtDNA	mitochondriální deoxyribonukleová kyselina
Na_2ATP	sodná sůl adenosintrifosfátu
Na_2HPO_4	hydrogenfosforečnan sodný
NaCl	chlorid sodný

NAD^+	nikotinamidadenindinukleotid (oxidovaná forma)
NADH	nikotinamidadenindinukleotid (redukovaná forma)
NaH_2PO_4	dihydrogenfosforečnan sodný
$NaHCO_3$	hydrogenuhličitan sodný
NaOH	hydroxid sodný
NCLX	sodíko-vápníkový výměník, a anglického $Na^+/Ca^{2+}/Li^+$ exchanger
NFT(s)	neurofibrilární klubíčka, z anglického neurofibrillary tangles
O	otevření komůrky oxygrafu
OCR	bazální spotřeba kyslíku, z anglického oxygen consumption rate
OCT	optická koherentní tomografie
OMM	vnější mitochondriální membrána, z anglického outer mitochondrial membrane
Omy	oligomycin
OXPHOS, P	oxidační fosforylace
PBMC	mononukleární buňky periferní krve, z anglického peripheral blood mononuclear cells
PBS, PBSG	fosfátový pufr, z anglického phosphate buffered saline (with glucose)
Pcar	palmitoyl-L-karnitin
PD	Parkinsonova choroba, z anglického Parkinson's disease
PDH	pyruvátdehydrogenáza
PET	pozitronová emisní tomografie
PK	pravá komora
PLT	krevní destičky, z anglického platelets
PPA	primární progresivní afázie
PSEN1	presenilin 1
Pyr	pyruvát
QH_2	redukovaný koenzym Q
RBC	počet červených krvinek, z anglického red blood count
ROS	reaktivní formy kyslíku, z anglického reactive oxygen species
Rot	rotenon
ROUT, R	bazální mitochondriální spotřeba kyslíku
ROX	reziduální spotřeba kyslíku
rRNA	ribozomální ribonukleová kyselina
S	sukcinát
SDH/II	sukcinátdehydrogenáza, respirační komplex II
SIRT	sirtuiny
SOD	superoxiddismutáza
SPECT	jednofotonová emisní tomografie, z anglického Single Photon Emission Tomography
SSRI	selektivní inhibitory zpětného vychytávání serotoninu, z anglického selective serotonin reuptake inhibitors
TCA	cyklus trikarboxylových kyselin, Krebsův cyklus
TMPD	tetrametyl-p-fenylendiamin
tRNA	transferová ribonukleová kyselina
TRO	trombocyty

U	uzavření komůrky oxygrafu
UCP1	z anglického uncoupling protein 1
V	ATP syntáza
VaD	vaskulární demence
VDAC	napěťově závislý aniontový kanál, z anglického voltage-dependent anion channel
WBC	počet bílých krvinek, z anglického white blood count
WHO	Světová zdravotnická organizace, z anglického World Health Organization

1 Stárnutí a syndrom demence – teoretická část

1.1 Stárnutí a demence

Stárnutí není příčinou demence. Současně je faktem, že se syndrom demence různé etiologie vyskytuje převážně v pokročilém věku. Věk patří mezi nejvýznamnější rizikové faktory vzniku syndromu demence, což je velmi dobře dokumentováno u Alzheimerovy choroby (AD, z anglického Alzheimer's disease) [Guerreiro, 2015], která je se zhruba 70 % nejčastější příčinou demence [Pidrman, 2007; Jirák, 2007]. Na základě recentních souhrnných dat z USA se AD raritně vyskytuje ve věku pod 65 let, mezi 65. a 74. rokem je prevalence 3 %, mezi 75. a 84. rokem již 17 % a v kategorii dlouhověkých lidí nad 85 let je celková prevalence 32 % [Alzheimer‘s Association, 2020]. Podobný trend ovšem nalézáme také u dalších příčin syndromu demence, a to jak u neurodegenerativních, tak sekundárních. Frontotemporální demence (FTD) a demence s Lewyho tělísky (DLB, z anglického Dementia with Lewy bodies) patří vedle AD do skupiny 3 nejčastějších neurodegenerativních chorob, jež vedou k rozvoji klinicky manifestního syndromu demence a také se častěji vyskytují ve stáří [Hogan et al., 2016a; Hogan et al., 2016b]. FTD se zároveň relativně četněji podílí také na demenci středního věku, což je mimo jiné pravděpodobně způsobeno vyšším podílem geneticky vázaných případů a nedostatečnou diagnostickou přesností ve vyšších věkových kategoriích. Celkově prevalence FTD s postupujícím věkem nepochybně stoupá [Hogan et al., 2016b]. Mezi sekundárními demencemi v četnosti dominuje vaskulární demence (VaD), která jako samostatný etiologický činitel zodpovídá za 5–10 % případů syndromu demence [Alzheimer‘s Association, 2020]. Její výskyt stoupá s věkem exponenciálně [Yang et al., 2017]. Zároveň se VaD často podílí na vzniku smíšené demence, jejímž podkladem je kombinace působení dvou nebo více etiopatogenetických mechanismů. Smíšené demence mohou být zodpovědné za více než 50 % případů syndromu demence a jejich prevalence opět významně narůstá s velmi pokročilým věkem [Alzheimer‘s Association, 2020].

Z výše uvedeného vyplývá mnohovrstevnatá provázanost stárnutí a demence, nikoli kauzální vztah. Tyto fenomény jednoduše oddělit nelze. Všechny charakteristické biologické procesy, které jsou integrální součástí stárnutí, jsou přítomné také u stárnutí s demencí, zároveň se mnoho patologických známek vyskytujících se u syndromu demence (např. alzheimerovské plaky u AD) objevuje při zdravém stárnutí, respektive stárnutí bez demence [Wahl et al., 2019]. Zdravé stárnutí a stárnutí lidí s kognitivní poruchou tedy často odlišuje spíše stupeň patologického nálezu, než patognomické rysy [Anderton, 1997]. Za jednu z takových známek

můžeme považovat hipokampální atrofii, která je přítomna u běžného stárnutí a zároveň je její vystupňovaná forma jedním z důležitých diagnostických markerů AD při zobrazení mozku neuroradiologickými metodami [Pini et al., 2016]. Totéž platí u frontální atrofie mozku a FTD [Chow et al., 2008]. Se stárnutím dochází také ke změnám mitochondriální funkce, rozvoji oxidačního stresu a neuroinflamaci, což jsou rysy, které v akcelerované formě provázejí také neurodegenerativní onemocnění [Yin et al., 2016]. Mezi další sdílené vlastnosti stárnutí a demence patří porucha metabolismu kalcia, synaptická dysfunkce a řada dalších [Wahl et al., 2019].

Z hlediska fenotypu můžeme konstatovat změny, u kterých je obtížné odlišit, zda se jedná o součást přirozeného involučního procesu při ontogenezi nebo o projev syndromu demence na podkladě patologické změny orgánového systému, především mozku. Mezi běžné projevy stárnutí patří například změny postoje a chůze. Interindividuálně se rozšiřuje základní postavení dolních končetin a ohýbá se trup v závislosti na míře sarkopenie postihující posturální svalstvo a degenerativních změn páteře a kloubů končetin. Dochází ke ztrátě ladnosti pohybu, která je typická pro jedince mladšího věku a rozvoji instability. Charakteristické je zpomalení chůze a zkrácení kroku. Tyto změny Růžička pojmenovává jako „opatrnou chůzi“ starších jedinců. Zpomalení chůze, širší báze při postoji a instabilita ale také provázejí frontální apraxii chůze, například při AD, mnohočetném ischemickém postižení frontálních laloků při vaskulární demenci nebo normotenzním hydrocefalu [Kalvach et al., 2004]. Zde může být rozlišení patologické a involuční příčiny – obzvláště v počátečních stádiích choroby – velmi složité, nicméně zásadní pro podobu trajektorie stárnutí daného jedince.

Podobnosti a úzce provázané souvislosti mezi stárnutím a demencí najdeme zejména na úrovni psychologických změn. S vědomím částečného zjednodušení a značné interindividuální variability lze konstatovat, že jednou z osobnostních změn ve vyšším věku je změna adaptability na vnější podněty. Můžeme ji popsat jako jakousi zvýšenou rigiditu v postojích, což souvisí s nevyhnutelným prodloužením potřebného času pro přizpůsobení se vnější skutečnosti a sníženou ochotou v odůvodněných případech upravit své dříve vyjádřené stanovisko [Kalvach et al., 2004]. S pokročilým věkem se částečně mění i další složky osobnosti. Ve vyšším věku je prokázán například úbytek neuroticismu, respektive posílení vyrovnanosti, stability, v krajním případě až rigidity. V zásadě se snižuje také úroveň otevřenosti, starší lidé jsou obecně konzervativnější a konvenčnější než mladí lidé. Změny jsou pozorovány i v dalších běžně zkoumaných rozměrech osobnosti, tj. svědomitosti, extraverzi a přívětivosti [Allemand et al., 2007; Specht

et al., 2011]. Osobnost se tedy v průběhu ontogeneze vyvíjí. Zároveň je vývoj značně interindividuálně variabilní a nezávisí pouze na věku, ale také na řadě dalších faktorů jako jsou například životní zkušenosti a společenské konsekvence [Specht et al., 2011]. Změny osobnosti u syndromu demence bývají také individuální, zároveň však vystupňované. Dle metaanalýzy z roku 2019 se s postupujícím kontinuem syndromu demence akcentuje pokles svědomitosti (zejména pokles vnitřní disciplíny a kompetentnosti) a extraverze, zejména dochází k povšechné redukci aktivit a asertivity. Naopak byla měřena výrazně vyšší míra neuroticismu s dominancí v emocionální zranitelnosti s vyšším rizikem depresivního prožívání [Islam et al., 2019]. Ve fázi mírné kognitivní poruchy (MCI, z anglického mild cognitive impairment) jsou změny vyjádřeny méně [Islam et al., 2019], což může opět znesnadňovat klinickou diferenciaci mezi změnami při normálním stárnutí a stárnutím s mozkovou patologií.

Jako další příklad lze uvést úroveň inteligence. Ta s postupujícím věkem neklesá, pokud budeme hodnotit tzv. krystalickou inteligenci, která je souhrnem naučených postupů, znalostí a schopností aplikovat takové poznatky. U některých jedinců se může vyskytnout i vzestup souhrnné krystalické inteligence. Naproti tomu úroveň tzv. fluidní inteligence, která je vrozená a zodpovídá za schopnost pružné a rychlé reaktivity na vnější podněty, se přirozeně snižuje již od střední dospělosti [Kalvach et al., 2004]. U syndromu demence je pokles inteligence průvodním jevem, i přesto může být složité rozlišit například klinicky nezávažnou a věkem podmíněnou poruchu paměti od takové, která vznikla na patologickém podkladě a bude progredovat do syndromu demence.

Výsledkem výše uvedených příkladů je většinově uznávaný předpoklad, že stárnutí a demence jsou dva velmi odlišné fenomény, které je zásadně důležité nezaměňovat. Zároveň jsou však jejich projevy a vlastnosti někdy zdánlivě podobné.

1.2 Screening kognitivních poruch

V primární péči zůstává značné množství pacientů s kognitivní poruchou nediagnostikovaných. Dle souhrnné systematické studie Bradforda z roku 2009 jde zhruba o polovinu nemocných bez ohledu na tíži poruchy. Ve stádiu lehké demence a celkově diskrétních symptomů se diagnostická senzitivita dále snižuje (9–41 %) s velkou variabilitou dle charakteru jednotlivých prací. Studie Bradforda ovšem nezdůrazňuje udanou prevalenci nediagnostikovaných jako obecně využitelný údaj, naopak upozorňuje na limity v takové kalkulaci. Přesto naléhavě upozorňuje, že počet takových nemocných je alarmujícím způsobem vysoký a je nutné zpřesnit diagnostiku v primární péči [Bradford et al., 2009]. Zároveň je z mnoha důvodů vhodné zahájit nefarmakologické i farmakologické intervence včas [Holmerová et al., 2007].

Vzhledem k odhadované prevalenci a závažné prognóze syndromu demence v čele s Alzheimerovou chorobou, jejíž preklinická fáze trvá roky až desetiletí, se celosvětově vede debata o vhodnosti zavedení screeningu u asymptomatické populace vyššího věku. Hlavním cílem je identifikovat nemocné ve stádiu mírné kognitivní poruchy (MCI) nebo lehkého stádia demence, čímž je umožněno včas diagnostikovat etiologický podklad a zahájit adekvátní symptomatickou léčbu. Také se prodlouží čas, kdy je možné s kognitivně málo alterovaným nemocným plánovat další péči, zjistit jeho preference, potřeby a hodnoty, stejně tak jeho blízkých. V ČR byl plošný screening v ordinacích praktických lékařů zahájen v roce 2020. Jako vstupní test se využívá tzv. Mini-Cog test [Kadeřávková, 2020]. Počet provedených testů narůstá [VZP, 2024]. Zajímavé ovšem je, že například Kanada, USA ani Velká Británie ve svých odborných stanoviscích zatím nedoporučují zavedení celonárodního screeningu [Pottie et al., 2016; Owens et al., 2020; UK National Screening Committee, 2019]. Jako základní riziko jsou zmiňovány falešně pozitivní výsledky, které mohou pacientům způsobit zbytečnou psychickou zátěž a vést k nadměrným zdravotnickým intervencím. Dostupné screeningové kognitivní testy nejsou obecně dostatečně přesné pro detekci mírných symptomů, natož pro preklinickou fázi. Druhým významným omezením je nedostatečná nabídka efektivních intervencí pro pacienty, u nichž byla MCI nebo preklinická fáze demence diagnostikována, čímž je myšlena zejména absence účinné kauzální léčby. Současně dostupná farmakologická léčba, jako jsou inhibitory acetylcholinesterázy nebo memantin, není indikována v preklinické fázi, kde nelze očekávat efekt. Intervence zaměřené na úpravu životního stylu, jako je fyzická aktivita či stravovací návyky, jsou sice slibné, ale jejich dopad je omezený.

Další dostupné metody potenciálního screeningu pro jednotlivé etiopatogenetické činitele syndromu demence (např. PET nebo vyšetření mozkomíšního moku u AD), které účinně prokazují patologický substrát již v preklinické fázi, jsou mimo další nevýhody příliš nákladné a nevhodné k implementaci jako screening [Mitchell a Black, 2016]. Lze však předpokládat, že pokud se objeví účinná léčba AD, tak kontroverze kolem kognitivního screeningu rychle zmizí. Zároveň výzkum k identifikaci dostupného biomarkeru alzheimerovské patologie bude mít již zásadní klinický význam.

1.3 Alzheimerova choroba

1.3.1 Obecné informace

Alzheimerova choroba, moderněji alzheimerovské kontinuum [Aisen et al., 2017], se jako hlavní etiopatogenetický činitel syndromu demence vyznačuje vysokou a stále vzrůstající prevalencí [Kunc et al., 2022]. Celosvětově se dle veřejně dostupných údajů WHO syndrom demence jakékoli etiologie vyskytuje u více než 55 milionů lidí, z toho je 60–70 % připisováno AD [WHO, 2023]. Jedná se o kvalifikované odhady, v ČR též nemáme přesná data, nicméně již v roce 2015 odhady přesahovaly 150 000 nemocných se syndromem demence. Trend ukazuje, že se prevalence zdvojnásobí každých dvacet let, což vede k očekávání, že v roce 2050 bude trpět syndromem demence zhruba 130 milionů lidí po celém světě [Mátl a Mátlová, 2015].

Alzheimerova choroba se klinicky projevuje postupným a setrvalým zhoršováním mozkových funkcí. Nejprve se obvykle manifestují poruchy kognitivních schopností, následované deteriorací nekognitivních funkcí a výskytem behaviorálních a psychologických příznaků. Tento proces nevyhnutelně vede ke ztrátě schopnosti samostatně fungovat a nakonec i k úmrtí [Pidrman, 2007].

Při podrobnější analýze můžeme rozlišit 3 základní stádia (preklinické, mírnou kognitivní poruchu při AD a syndrom demence při AD, který se běžně dále rozděluje na lehký, středně těžký a těžký), jejichž vzájemná transformace probíhá plynule a nenápadně [Alzheimer‘s Association, 2020].

Preklinické stádium je charakterizováno průkazem biomarkerů (viz níže) a zároveň absencí klinických příznaků nemoci. Toto stádium může trvat roky až desítky let. Zároveň není jisté, že se u pacienta s pozitivním nálezem biomarkerů klinicky manifestní nemoc skutečně rozvine, riziko je však zvýšeno výrazně [Sperling et al., 2011].

Mírná kognitivní porucha při AD bývá charakterizována příznaky mírného kognitivního deficitu, které jsou důsledkem alzheimerovských patologických změn. Nevede ovšem ke zhoršení soběstačnosti. Zároveň je přítomen pozitivní průkaz biomarkerů, čímž je odlišena MCI jiné etiologie. Stádium MCI je svou délkou výrazně interindividuálně variabilní a nezanedbatelné množství případů (26 %) dokonce konvertuje zpět do normálního kognitivního stavu (pozn. toto číslo platí pro MCI bez ohledu na etiologii) [Canevelli et al., 2016; Alzheimer's Association, 2020]. Recentní retrospektivní analýza prokázala 45,45% konverzi MCI s pozitivním průkazem biomarkeru AD (využito vyšetření mozkomíšního moku) do klinicky manifestní AD. Průměr doby sledování byl 1,4 roku u jedinců s progresí a 2,5 roku u jedinců bez progrese [López-Cuevas et al., 2023].

Ve stádiu lehké demence již potřebují postižení jedinci občasnou asistenci (s vysokým rizikem je spojena například správa financí). Některé činnosti, včetně běžných denních aktivit, trvají nezvykle dlouho proti předchozím letům. Úroveň exekutivních funkcí se snižuje, což se projevuje mimo jiné zhoršenou schopností plánovat, organizovat a také zhoršeným úsudkem. V mnoha ohledech je ovšem zachována nezávislost [Alzheimer's Association, 2020].

Ve stádiu středně těžké demence se akcentuje porucha paměti, dochází k dezorientaci. Pomoc je již nutná také při běžných denních aktivitách. Trvalý dohled bývá nutný. Nemocní v této fázi jsou ještě ovšem schopni vykonávat řadu aktivit, především takových, které znají z minulosti a jsou pro ně rutinní. Délka stádia středně těžké demence při AD je vysoce variabilní (2–10 let) [Holmerová et al., 2013].

Ve stadiu těžké demence je výrazně omezena verbální komunikace, nemocní jedinci vyžadují nepřetržitou péči. Postupně dochází k úplné ztrátě soběstačnosti a rozvoji imobilizačního syndromu se všemi potenciálními důsledky. V terminálním stádiu nemoci dochází k poruše polykání a rozvoji inkontinence. Potřeba kvalifikované paliativní péče se stává dominantní [Holmerová et al., 2013].

1.3.2 Patofyziologie Alzheimerovy choroby

Vědecká obec se snaží pochopit podstatu AD již od roku 1907, kdy na tehdy zdánlivě raritní chorobu upozornili nezávisle na sobě Oskar Fischer a Alois Alzheimer [Goedert, 2009]. Po téměř 70 letech prokázal Katzman, že choroba není vzácná, ale naopak extrémně četná [Katzman, 1976], což logicky znamenalo prudký nárůst zájmu o její etiopatogenezi. Byla navržena řada teorií. Mezi nejskloňovanější

v dnešní době patří kromě jiných mitochondriální a metabolická hypotéza a zejména stále dominantní amyloidová hypotéza.

Amyloidová hypotéza

U amyloidové hypotézy je považován za klíčový faktor patogeneze AD nadprodukce a agregace β-amyloidu (Aβ), peptidu vznikajícího štěpením amyloidového prekurzorového proteinu (APP) cestou β- a γ-sekretázy. Vznikající amyloidové plaky, extracelulární depozita Aβ, jsou typickým histopatologickým znakem AD [Hardy a Higgins, 1992; Selkoe a Hardy, 2016], nicméně hlavní neurotoxickou formou jsou proti původním předpokladům pravděpodobně přímo Aβ peptidy, zejména jejich oligomerní formy, které narušují synaptickou plasticitu, redukují množství dendritů a vedou k zániku neuronů, čímž dochází ke kognitivní deterioraci [Shankar et al., 2008; Esparza et al., 2013]. Cestou oligomerů Aβ je zřejmě indukována aktivace intraneuronálního tau proteinu hyperfosforylací [Jin et al., 2011], ačkoli toto propojení zatím není definitivně prokázáno [Liu et al., 2019]. Tau protein za fyziologických podmínek stabilizuje mikrotubuly a zajišťuje axonální transport [Šerý et al., 2013]. Při změně úrovně fosforylace tau proteinu dochází k destabilizaci mikrotubulů a tvorbě neurofibrilárních klubíček (NFT, z anglického neurofibrillary tangles) [Iqbal et al., 2010]. NFT prionovým mechanismem expandují do okolních neuronů, kde alterací mitochondrií a aktivací oxidačního stresu působí neurotoxicky [Ricciarelli a Fedele, 2017; Sharma et al., 2019]. Je prokázáno, že úroveň tau patologie koreluje s klinickými projevy AD lépe než amyloidové plaky, což naznačuje, že se jedná o klíčový faktor neurodegenerace [Serrano-Pozo et al., 2011].

Amyloidová hypotéza zůstává zřejmě nejvýznamnější teorií, její kredibilitu nicméně zpochybňují určité kontroverze. Mezi vybrané patří například disproporce mezi lokalizací amyloidových plaků a oblastmi neurodegenerace. Zatímco Aβ se hromadí primárně v parietální a frontální kůře, neurodegenerace začíná v hipokampu a entorhinální kůře, což lépe koreluje s tau patologií [Braak et al., 1999]. Je však argumentováno, že Aβ je iniciátorem procesu a hyperfosforylovaný tau protein přímým spouštěčem neurodegenerace [Selkoe a Hardy, 2016]. Pochybnost vyvolává také fakt, že u některých jedinců s významnou depozicí amyloidu není zaznamenána kognitivní porucha. Tento jev naznačuje, že samotná přítomnost amyloidu nemusí být dostatečná k vyvolání klinických příznaků [Aizenstein et al., 2008]. Asi nejskloňovanějším protiargumentem je ale dosavadní selhání terapeutických postupů, které jsou na amyloidové hypotéze založené [Cummings et al., 2019].

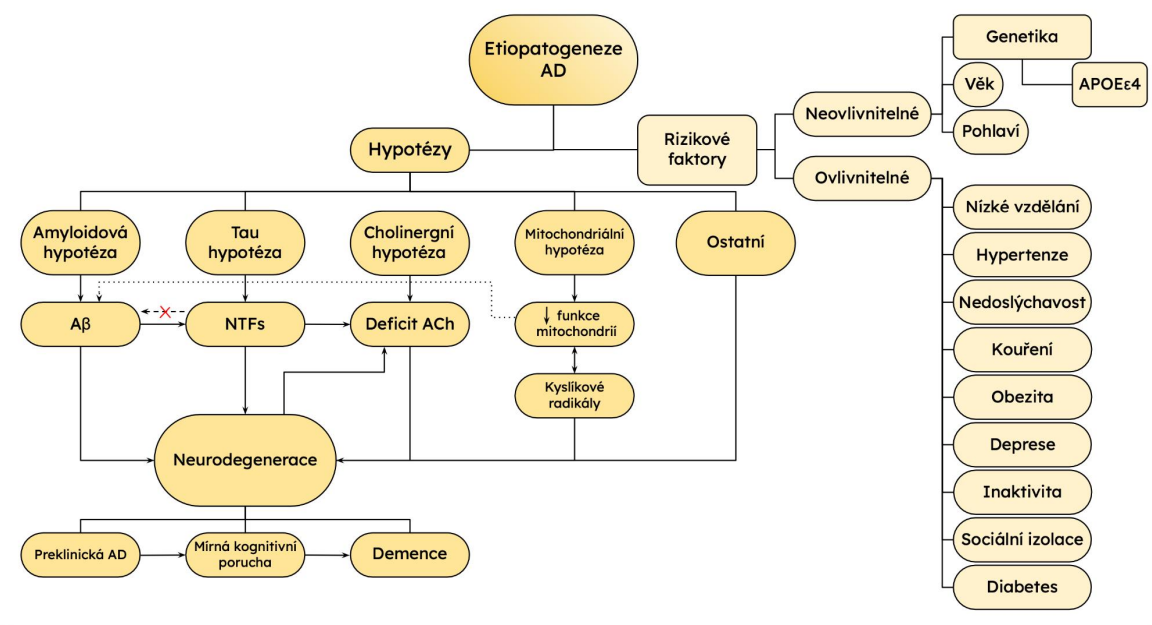
Mitochondriální hypotéza

Mitochondriální teorie sporadické AD, uceleně publikovaná Swerdlowem a Khanem v roce 2004, předpokládá, že s věkem dochází k progresivnímu poklesu mitochondriální funkce, což vede k energetickému deficitu, nadprodukci kyslíkových radikálů a poškození mitochondriální DNA (mtDNA) [Swerdlow a Khan, 2004]. Důležitou roli hrají také poruchy fúze a štěpení mitochondrií, jejich transportu a degradace [Calkins a Reddy, 2011]. Tyto a další změny narušují buněčný metabolismus a vedou k patologickým procesům typickým pro AD, jako je hromadění amyloidu a hyperfosforylace tau proteinu [Swerdlow a Khan, 2004]. Zásadním rozdílem oproti tradičnímu uvažování je zde předpoklad, že AD a stárnutí sdílejí společné mechanismy, respektive že nejde o procesy vzájemně oddělené [Swerdlow a Khan, 2009].

Mezi související procesy patří také metabolické alterace, respektive energetická dysbalance a snížená utilizace glukózy v mozku pacientů s AD. Tento fenomén lze detekovat i mnoho let před manifestací kognitivní dysfunkce. Snižuje se koncentrace klíčových metabolitů, jako jsou meziprodukty Krebsova cyklu (např. oxalacetát, α-ketoglutarát) a acetyl-CoA, což negativně ovlivňuje epigenetické procesy, včetně metylace a acetylace DNA [Mastroeni et al., 2010].

Dle recentně publikované mitochondriální-neurovaskulární-metabolické hypotézy (MNM hypotéza) je třetím klíčovým prvkem v patogenezi AD neurovaskulární dysregulace. Dochází k narušení hematoencefalické bariéry, pronikání neurotoxických látek do mozkové tkáně a snížení mozkové perfuze, což dále akceleruje patologické procesy při AD [Kazemeini et al., 2024]. V raných fázích AD bylo zjištěno poškození hematoencefalické bariéry i před výskytem amyloidových plaků, což poukazuje na roli cévní dysregulace v časné patogenezi [Bell a Zlokovic, 2009].

Mitochondriální hypotéza (a příbuzné jako je např. MNM hypotéza) nabízí propojení s dalšími patogenetickými mechanismy. Kromě již zmíněného vlivu poruchy mitochondriálních funkcí, která amplifikuje tvorbu Aβ a hyperfosforylaci tau proteinu, mohou energetický deficit a oxidační stres přispívat k narušení synaptické plasticity a neurodegeneraci. Experimentální data naznačují, že stimulace mitofagie nebo mitochondriální biogeneze by mohly přispět k prevenci nebo zpomalení progrese AD [Fang et al., 2019]. Navzdory rostoucímu množství důkazů je zapotřebí dalšího výzkumu k objasnění role mitochondriálních a metabolických faktorů v patogenezi AD, aby bylo možné pokročit ve vývoji terapeutických strategií.



Obrázek 1 – Hypotézy a rizikové faktory AD
AD = Alzheimerova choroba, z anglického Alzheimer's disease; ACh = acetylcholin; NFTs = neurofibrilární klubíčka, z anglického neurofibrillary tangles; Aβ = amyloid beta. Převzato a upraveno dle Kunc et al., 2022.

1.3.3 Biomarkery

Alzheimerova choroba jako původně klinicko-patologická entita byla v posledních letech zejména pro účely výzkumu redefinována na biologickou. Přítomnost AD je tedy podle amerického National Institute on Aging and Alzheimer's Association podmíněna průkazem biomarkerů, tedy vyhrazena situaci, kdy je určenými moderními diagnostickými metodami specificky potvrzena přítomnost patognomických známek AD, zejména amyloidu beta (Aβ) a intracelulárních neurofibrilárních klubíček (NFT). Dominantními metodami na tomto poli jsou zobrazovací metody, zejm. pozitronová emisní tomografie (PET) a vyšetření mozkomíšního moku. Podle této definice nehraje roli přítomnost klinických příznaků nemoci [Jack et al., 2018]. Bez ohledu na kontroverze v přijetí této definice [Dubois et al., 2021] se pozornost obrací k preklinické fázi AD a k otázkám, jak nejlépe predikovat, že skutečně dojde k rozvoji manifestní AD, tedy k roli biomarkerů.

Výzkum biomarkerů je extenzivní a jejich potenciální využití široké. Identifikace biomarkerů je klíčová pro potvrzení alzheimerovské patologie in vivo a včasnou diagnostiku, predikci progrese a vývoj účinných terapeutických intervencí. Základně lze biomarkery rozdělit na několik kategorií.

Diagnostické biomarkery zahrnují zobrazovací metody, jako je PET vyšetření s průkazem amyloidu a/nebo tau proteinu a analýzu patologických proteinů v mozkomíšním moku. Amyloid-PET dle četných studií vykazuje více než 90% senzitivitu i specificitu pro diagnostiku AD (s minimálními rozdíly při použití různých radiofarmak) [Palmqvist et al., 2015; Morris et al., 2016]. Biomarkery mozkomíšního moku, respektive peptidy $A\beta_{1-42}$, celkový i hyperfosforylovaný tau protein, a zejména jejich kombinace, také vykazují vysokou diagnostickou přesnost (nad 90 %) u AD [Lleó et al., 2018]. Nevýhodou metod je jejich invazivita a vysoké ekonomické náklady, což neumožňuje jejich široké využití v klinické praxi [Klyucherev et al., 2022].

Okulární biomarkery, jejichž podstatou je detekce strukturálních abnormalit sítnice ještě před manifestací kognitivních příznaků, využívají především zobrazování sítnice prostřednictvím optické koherentní tomografie (OCT). Degenerativní změny sítnice a neurodegenerace CNS u AD probíhají pravděpodobně simultánně, což otevírá možnosti neinvazivní diagnostiky AD [García-Bermúdez et al., 2023]. V klinické praxi se v současné době nevyužívají.

Krevní biomarkery představují lákavou alternativu. Primárně jde opět o snahu o detekovat některou formu Aβ nebo proteinu tau, nicméně bez nutnosti využití nákladných a nadměrně invazivních postupů. Například hladiny pTau181 v plazmě ukazují vysokou korelaci s patologickými změnami detekovanými pomocí PET [Mielke et al., 2018]. Poměr $A\beta_{40}/A\beta_{42}$ v krvi dobře koreluje s akumulací amyloidu v mozku, a zejména společně s ApoE genotypizací je navržen jako screeningový test alzheimerovské patologie [Palmqvist et al., 2019]. V obecnosti moderní analytické metody, jako je hmotnostní spektrometrie, umožňují vysoce přesnou kvantifikaci těchto markerů, což otevírá možnosti pro nalezení dostatečně přesného screeningového nástroje v blízké budoucnosti. Potenciálních krevních biomarkerů jsou popsány minimálně desítky a netýkají se pouze Aβ a tau patologie. Kombinace krevních biomarkerů s klinickým kognitivním testováním by mohla zlepšit diagnostickou přesnost a identifikovat pacienty k dovyšetření [Klyucherev et al., 2022].

Ke krevním biomarkerům můžeme zařadit mimo jiné markery, které odrážejí úroveň mitochondriálních funkcí. Patří mezi ně například analýza změn mtDNA, produkce kyslíkových radikálů a také změny na úrovni oxidační fosforylace. Byly například publikovány studie, které poukazují na alterované funkce mitochondrií v trombocytech, konkrétně na sníženou úroveň bazální respirace a snížení maximální kapacity dýchacího řetězce, včetně snížení aktivity

komplexu IV [Fišar et al., 2016; Fišar et al., 2019a].

1.4 Demence s Lewyho tělísky

Demence s Lewyho tělísky (DLB, z anglického Dementia with Lewy bodies) je časté neurodegenerativní onemocnění charakterizované hromaděním α-synukleinu, jehož výsledkem jsou intracelulární inkluze zvané Lewyho tělíska. Tento společný mechanismus sdílí s Parkinsonovou nemocí (PD, z anglického Parkinson's disease), u DLB ovšem dochází k šíření patologie predilekčně do mozkové kůry, zatímco u PD se inkluze primárně rozvíjí v substantia nigra. Je však pravděpodobné, že se jedná pouze o různé fenotypy stejného neurodegenerativního procesu. Kromě agregace α-synukleinu se v patofyziologii uplatňuje také interakce s alzheimerovskou patologií, zejména s Aβ a tau proteinem, jež se vyskytují u mnoha pacientů s DLB. To může přispívat ke klinickému překryvu mezi DLB a AD [Gomperts, 2016]. V patofyziologii DLB je také popisován vliv mitochondriální dysfunkce, zejména v rychle progredující formě DLB. Mimo jiné dochází k výraznému snížení aktivity komplexů I–IV elektrontransportního systému (ETS) [Garcia-Esparcia et al., 2017].

Klinicky se DLB projevuje kromě různé míry globální kognitivní deteriorace relativně specifickými rysy, jako jsou zrakové halucinace, porucha REM spánku spojená s poruchou chování a parkinsonskými příznaky. Charakterické jsou také fluktuace stavu. Diagnostika se v běžné praxi řídí klinickými kritérii, biomarkery zvyšují diagnostickou přesnost a lépe diferencují DLB proti jiným příčinám demence (zejména AD), nicméně se pro omezenou dostupnost a vysoké náklady využívají jen ve sporných případech nebo ve specializovaných centrech. Léčba DLB zahrnuje farmakologické a nefarmakologické postupy. Inhibitory acetylcholinesterázy mohou zmírnit kognitivní a behaviorální příznaky. Antiparkinsonika mají naopak omezenou účinnost a mohou zhoršovat psychotické projevy. Kauzální léčba neexistuje, o to více se akcentuje komplexní multidisciplinární podpora pacientovi i pečujícím [McKeith et al. 2017].

1.5 Frontotemporální lobární degenerace

Frontotemporální lobární degenerace (FTLD), také označovaná jako frontotemporální demence (FTD), je neurodegenerativní onemocnění charakterizované progresivní atrofií frontálních a temporálních laloků mozku, což

se klinicky projevuje změnami chování, osobnosti, poruchami řeči a v některých případech motorickou dysfunkcí. Historicky nebyla FTLD dlouho diferencována od jiných forem demence, zejména AD. V patofyziologii sdílí FTLD a AD akumulaci hyperfosforylovaného tau proteinu [Ulugut a Pijnenburg, 2023]. Mitochondriální dysfunkce, včetně poškození mitochondriální respirace, se pravděpodobně také podílí na patogenezi FTLD [Leskelä et al., 2021].

Dle klinického obrazu se rozděluje na 2 hlavní subtypy, behaviorální variantu FTLD (bvFTLD) a primární progresivní afázii (PPA). bvFTLD se projevuje se zejména změnami osobnosti, sociálního chování a emoční regulace. PPA má několik variant, kde dominují různé formy poruchy řeči. Poruchy paměti a prostorové orientace sice nejsou typické pro počáteční stádia onemocnění, ale mohou se objevit sekundárně při poruše exekutivních funkcí, motivace a pozornosti, zároveň jsou běžné při progresi onemocnění.

Diagnóza FTLD je založena na klinickém vyšetření, neuropsychologickém testování a zobrazovacích metodách. Magnetická rezonance mozku typicky prokazuje atrofii frontálních a temporálních laloků. Metody jako PET a SPECT zobrazují hypometabolismus v postižených oblastech, nicméně nejsou vhodné k rutinnímu využívání.

Jako u řady dalších neurodegenerativních onemocnění kauzální léčba FTLD neexistuje. Symptomatická terapie behaviorálních symptomů mimo nefarmakologickou podporu pacienta a jeho rodiny využívá například antidepresiva z řady SSRI (selektivní inhibitory zpětného vychytávání serotoninu, z anglického selective serotonin reuptake inhibitors), případně, pokud je to nezbytné, antipsychotika. Logopedie a kognitivní rehabilitace mohou pomoci v raných stádiích PPA [Ulugut a Pijnenburg, 2023].

1.6 Vaskulární demence

Vaskulární demence (VaD) je způsobena obvykle mnohočetnou lokalizovanou poruchou krevního zásobení mozku a chronickou hypoperfuzí. Typický je výskyt mnohočetných lakunárních infarktů a drobných hemoragií. Na výsledném kognitivním deficitu se samozřejmě mohou podílet také mozkové příhody většího rozsahu. Rizikové faktory jsou shodné s aterosklerotickými [Biessels, 2016]. Porucha mitochondriální funkce včetně snížené aktivity respiračních komplexů je u VaD také dokumentována [Li et al., 2016; Chen et al., 2024].

Klinické projevy vaskulární demence jsou heterogenní a závisí na lokalizaci a rozsahu cévního poškození. Typicky se objevuje globální kognitivní deteriorace, konkrétně poruchy myšlení, pozornosti, zpomalení psychomotorického tempa nebo porucha paměti, která může být méně dominantní než u AD. Časté je motorické postižení, například rozličné typy poruchy chůze, inkontinence moči, dysartrie a také behaviorální a psychologické symptomy od apatie, deprese až po projevy podobné FTLD [Biessels, 2016].

Diagnostika VaD se opírá o klinické vyšetření, kognitivní testování a zobrazovací metody. Musí být prokázána přítomnost kognitivní poruchy společně s průkazem vaskulárního postižení mozku (dominantně se využívá MRI, případně CT vyšetření) a souvislost mezi nimi [Sachdev et al., 2014].

Specifická léčba VaD neexistuje. Intervence jsou zaměřeny na prevenci progrese onemocnění a symptomatickou léčbu. Důležitou roli hraje přísná kontrola vaskulárních rizikových faktorů (arteriální hypertenze, dyslipidémie, diabetu, kouření aj.). Antitrombotická léčba je indikována u pacientů s anamnézou ischemické cévní mozkové příhody. Inhibitory acetylcholinesterázy jsou indikovány u smíšené demence s AD [Biessels, 2016].

1.7 Zvířecí modely Alzheimerovy choroby

Experimentální zvířecí modely neurodegenerativních chorob jsou nezbytné pro výzkum patofyziologie onemocnění a pro hledání a ověřování terapeutických intervencí. Ve výzkumu se nejvíce využívají malí laboratorní hlodavci, zejména transgenní myši a potkani – u nich navozený model AD však spíše odpovídá její dědičné formě s časným nástupem, tedy variantě onemocnění, která je zodpovědná za přibližně 1 % případů u lidí. V současné době je naprostá většina modelů AD založena na expresi transgenů pro lidské proteiny spojené s patofyziologií AD – častá je kombinace lidského APP společně s presenilinem 1 (PSEN1). U většiny myších modelů lze prokázat akumulaci amyloidu a mozkovou amyloidní angiopatii, které mohou, ale nemusí být spojené s poruchou kognitivních funkcí. Často však postrádají další patologické známky AD, zejména tvorbu NFT a neurodegeneraci. Potkaní modely umožňují snazší manipulaci, odběr mozkomíšního moku, elektrofyziologická měření ve srovnání s myšmi a standardně vykazují kognitivní deficit [Drummond a Wisniewski, 2017].

Chemicky navozené modely sporadické formy onemocnění u potkana zahrnují intracereboventrikulární aplikaci streptozotocinu, amyloidu nebo skopolaminu. Jejich nevýhodou je náhlý nástup symptomatologie AD, což neodpovídá průběhu onemocnění u lidí, a chybějící patologicko anatomické znaky, zejména akumulace Aβ a hyperfosforylovaného tau proteinu. Kromě toho vyžadují značnou zručnost experimentátora [Akhtar et al., 2022].

Tzv. fyziologické modely sporadické formy AD jsou staří jedinci živočišných druhů, u kterých se přirozeně vyvíjí symptomatologie AD. Největší pozornost byla a je věnována subhumánním primátům, zejména makakům (Rhesus a Cynomolgus), kosmanům a paviánům. Navzdory úplné homologii sekvencí lidského a opičího Aβ není posmrtný neuropatologický nález vždy jednotný a často neodpovídá nálezu u lidí. NFT jsou přítomna jen vzácně [Ferrer, 2024]. V běžném výzkumu je využitelnost těchto modelů omezená z důvodů velkých finančních nákladů a obvykle dlouhé době dožití u jednotlivých druhů opic (až 40 let). Osmák degu je malý jihoamerický hlodavec dožívající se až 9 let. Jeho Aβ se liší od lidského v jediné aminokyselině a u starých jedinců se běžně vyskytují amyloidové plaky, NFT, astrocytóza, synaptické změny a ztráta neuronů [Ardiles et al., 2012; Braidy et al., 2015]. Existují však i experimentální studie, které považují využití osmáka degu jako přirozeného modelu AD za problematické [Steffen et al., 2016].

Genetický model Alzheimerovy choroby TgF-344 AD byl vytvořen Robertem M. Cohenem na Kalifornské univerzitě v roce 2013 [Cohen et al., 2013]. Do genetického pozadí potkana kmene Fisher-344 byly vloženy 2 lidské mutované geny: pro amyloidový prekurzorový protein (tzv. švédská mutace; APPsw) a exon 9 genu pro PSEN1. Potkani exprimující uvedené geny mají časné morfologické i funkční příznaky typické pro lidské onemocnění – vytváření depozit Aβ a NTF, neurodegeneraci a kognitivní deficitem [Kavkova et al., 2021; Proskauer Pena et al., 2021]. Chovné zařízení těchto potkanů je na LF UK v Plzni.

1.8 Mitochondrie

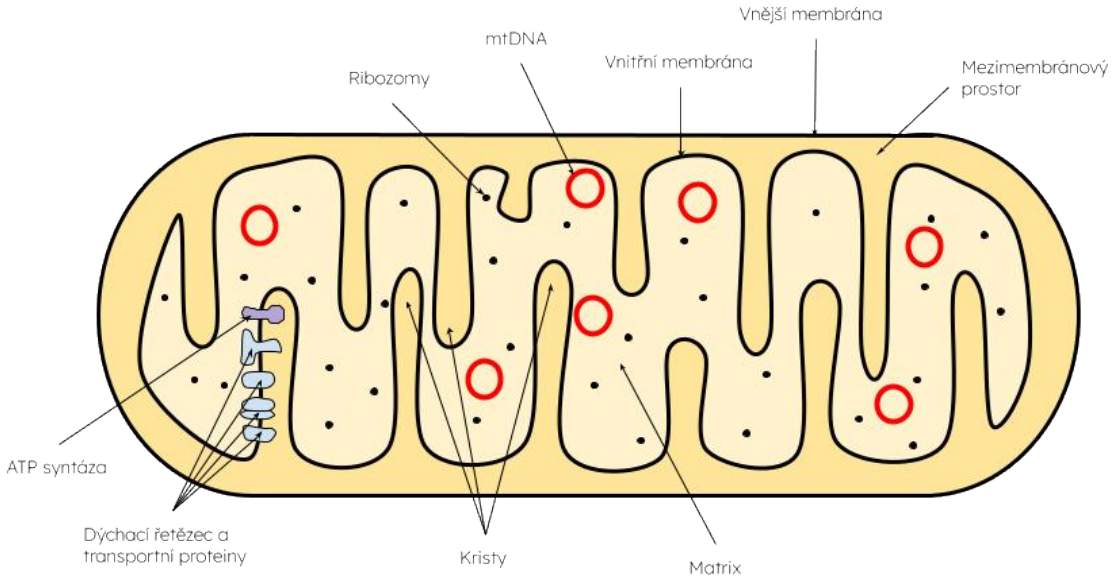
1.8.1 Struktura

Mitochondrie jsou morfologicky heterogenní buněčné organely, mají ovšem mnoho společných funkčních rysů. Předpokládá se, že vznikly zřejmě před dvěma miliardami let cestou tzv. unikátní endosymbiotické události, kdy předchůdce

dnešní eukaryotické buňky pohltil aerobní prokaryotické bakterie na základě „vzájemně výhodné spolupráce“. Bakterie poskytla buňce efektivní aerobní přeměnu energie výměnou za svou ochranu [Sagan, 1967].

S rozvojem mikroskopie v 2. polovině 19. století byly mitochondrie popsány poprvé pravděpodobně švýcarským anatomem Rudolfem Albertem von Köllikerem v kosterním svalu jako „světlá zrnka“ (blasse Kornchen), i když některé prameny uvádějí, že jako první publikoval obdobné pozorování v kosterním svalu německý anatom a patolog Jakob Henle [1841]. Název mitochondrie je připisován německému mikrobiologovi Carlu Bendovi [Benda, 1898], který si povšiml jejich podlouhlé struktury (mitos, řecky vlákno).

Savčí buňky obsahují mitochondrie v rozličných tvarech a počtech od několika jednotek (trombocyty) po tisíce na jednu buňku (myokard). Často mají podlouhlý tvar (2–4 μm) a průměr asi 1 μm, mohou však být mnohem delší nebo naopak kulovité [Scheffler, 2008]. Všechny dosud známé mitochondrie mají dvojitou membránu, vnější a vnitřní, mezi kterými se nachází mezimembránový prostor (IMS, z anglického intermembrane space). Vnitřek mitochondrie vyplňuje mitochondriální matrix (obrázek 2). Vnější mitochondriální membrána (OMM, z anglického outer mitochondrial membrane) je svým fosfolipidovým složením podobná buněčné membráně a slouží k výměně informace mezi cytoplasmou a mezimembránovým prostorem. Její propustnost závisí do značné míry na otevření či uzavření napěťově závislých aniontových kanálů (VDAC, z anglického voltage-dependent anion channel), které v otevřeném stavu umožňují přestup látek o relativní molekulové hmotnosti až 5000, tedy včetně výměny ADP (adenosindifosfát) a ATP (adenosintrifosfát) [Varughese et al., 2021]. Vnitřní mitochondriální membrána (IMM, z anglického inner mitochondrial membrane) je naopak značně nepropustná, volně přes ni přecházejí jen dýchací plyny, částečně voda. Ostatní látky nezbytné pro metabolické děje v mitochondriální matrix jsou sem dopravovány pomocí komplexně řízených proteinových výměníků. Charakteristickým rysem IMM je také speciální fosfolipidové složení a typické uspořádání do mitochondriálních krist, které vznikají zvlněním a vchlípením IMM. Součástí proteinového vybavení IMM jsou zejména respirační komplexy, které přenášejí elektrony odebrané ze substrátů na konečný akceptor, tj. kyslík. Mitochondriální matrix, tj. obsah mitochondrie ohraničený IMM, obsahuje velké množství enzymů intermediárního metabolismu, mitochondriální DNA (mtDNA), ribozomy, tRNA aj. Probíhá zde oxidace mastných kyselin, Krebsův cyklus (též citrátový cyklus, cyklus kyseliny citronové, cyklus trikarboxylových kyselin) a další procesy [Alberts, 1998].

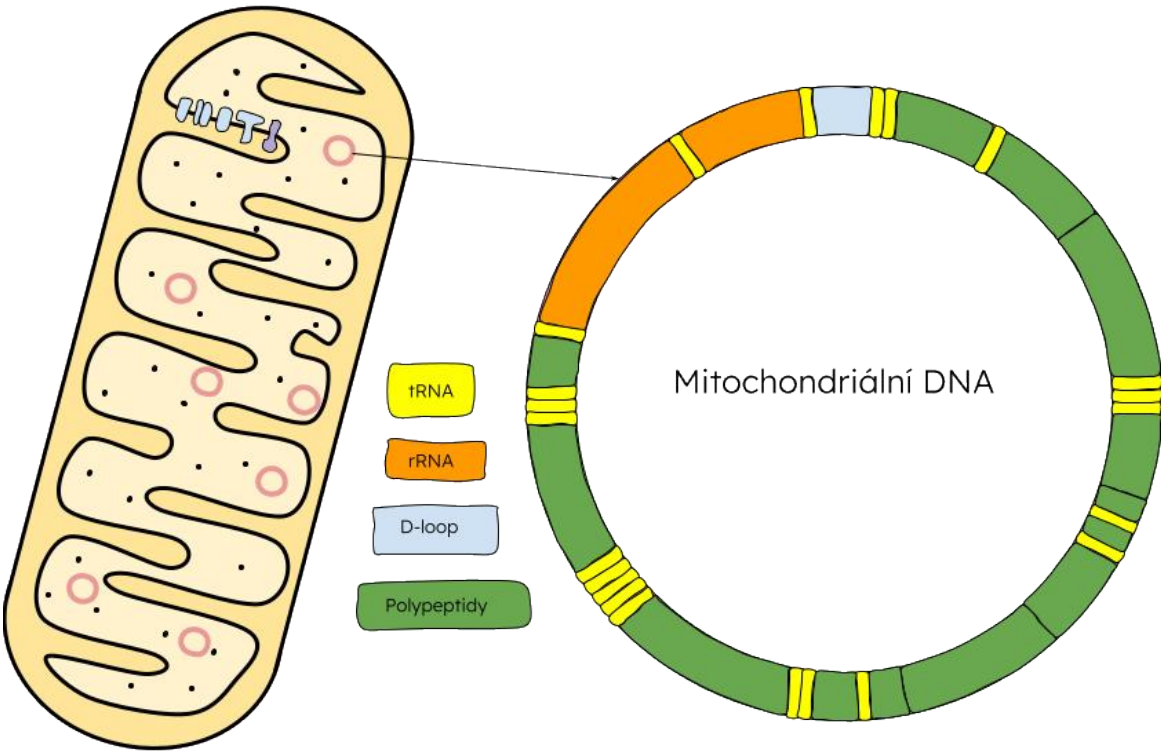


Obrázek 2 – Struktura mitochondrie
ATP = adenosintrifosfát; mtDNA = mitochondriální DNA.
Převzato a upraveno dle Yusoff, 2015.

Mitochondriální DNA

Specifikem mitochondrií proti dalším buněčným organelám je přítomnost vlastní kruhové DNA (mtDNA), která se nachází v několika kopiích v mitochondriální matrix společně s ribozomy (obrázek 2 a 3). Obsahuje 37 genů. DNA v mitochondriích kóduje jen menší část mitochondriálních proteinů (13), naprostá většina z nich je kódována v jádře buňky a dopravována do mitochondrie sofistikovanými transportními systémy [Raju et al., 2011; den Brave et al., 2024]. Ostatní geny jsou určeny pro transkripci tRNA (22) a rRNA (2). Část mtDNA zvaná D-loop (z anglického displacement loop) je nekódující oblast, která slouží jako regulační centrum pro replikaci a transkripci mtDNA, zároveň je charakteristická svou vysokou tendencí k mutacím [Ye et al., 2010]. K replikaci mtDNA nedochází jen při dělení buňky, ale v průběhu celého jejího životního cyklu. Zajímavým rysem spojeným s mtDNA je heteroplasmie, která označuje stav, kdy v buňce nejsou zcela totožné molekuly mtDNA. Tyto rozdíly se vyvíjí postupně na základě četných mutací, ke kterým je mtDNA náchylnější než jaderná DNA. K faktorům, které přispívají k této náchylnosti, patrně patří uspořádání mtDNA, která není na rozdíl od jaderné DNA chráněna histony, těsná blízkost mitochondriálního genomu a zdroje kyslíkových radikálů, nižší účinnost systémů oprav DNA ve srovnání s jaderným genomem a chybovost DNA polymerázy γ [Kujoth et al., 2005].

Míra, ve které jsou tyto relativně četné náhodné mutace mtDNA příčinou stárnutí a neurodegenerativních chorob, však zůstává nejasná [Kujoth a Prolla, 2008].



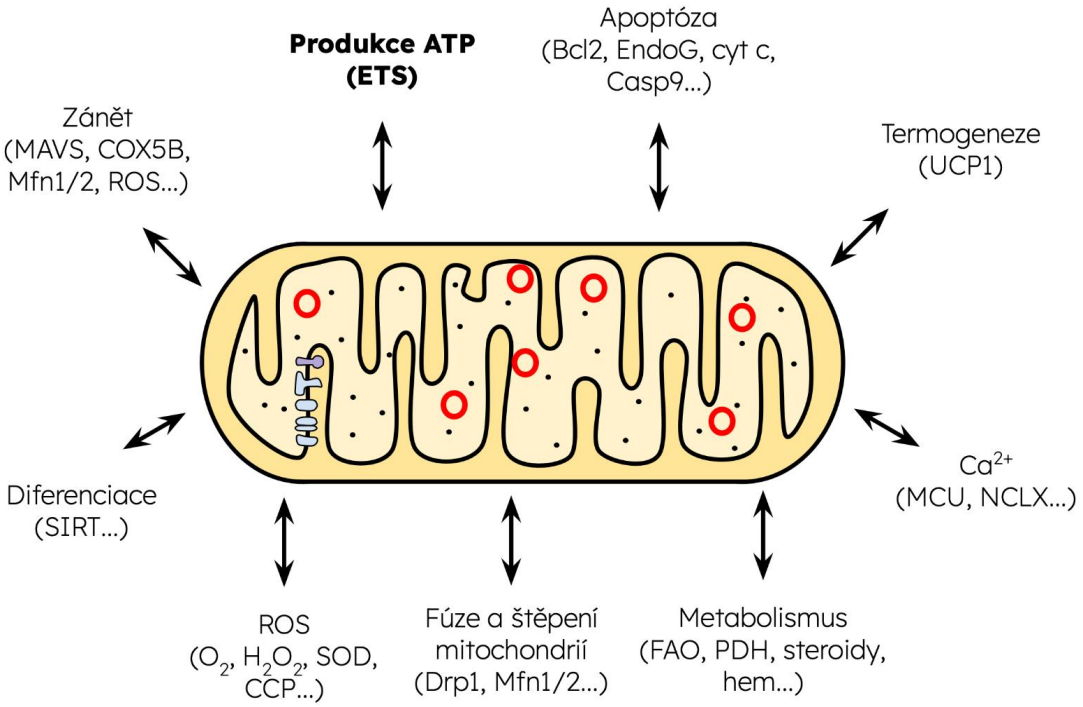
Obrázek 3 – Mitochondriální DNA
tRNA = transferová RNA; rRNA = ribozomální RNA; D-loop, z anglického displacement loop. Převzato a upraveno podle Raju et al., 2011.

1.8.2 Mitochondriální funkce

O mitochondriích je všeobecně známo, že jsou schopné přeměňovat energii všech živin na ATP, a tak fungují jako „mikroelektrárny buňky“ [Neužil, 2020]. Syntéza ATP je komplexní proces, který probíhá na vnitřní mitochondriální membráně a vyžaduje přenos elektronů pomocí respiračních komplexů (I–IV) horizontálně až na molekulární kyslík. Oxidace je spojena s transferem protonů (H^+) vertikálně, tj. přes IMM do mezimembránového prostoru. Akumulace protonů mezi oběma membránami mitochondrie je hlavní příčinou transmembránového napětí přes vnitřní MM a koncentračního spádu pro H^+, které mají stejný směr (tj. z mezimembránového prostoru do matrix) a pohánějí syntézu ATP z ADP a fosfátu ATP-syntázou. Ta se někdy označuje jako respirační komplex V, i když se vlastní oxidace (tj. přenosu elektronů) neúčastní [Alberts, 1998].

Kromě syntézy ATP se však mitochondrie podílejí na celé řadě dalších buněčných procesů (obrázek 4), zejména regulaci intracelulárního obratu iontů vápníku, čímž

ovlivňují signální dráhy, na syntéze nukleotidů, hemu nebo steroidů. Mitochondrie obsahují proteiny, které vstupují do spouštění a regulace apoptózy, zánětlivých procesů, fúze a fragmentace mitochondrií nebo diferenciace buněk. V hnědé tukové tkáni jsou mitochondrie schopné odpojit oxidaci od fosforylace a utratit transmembránový gradient na teplo pomocí tzv. rozpřahovacího proteinu UCP1 [Rossmann et al., 2021]. Podobné proteiny jsou exprimovány i v jiných tkáních, ale jejich role není zatím plně objasněna; mohou přispívat k regulaci hladiny reaktivních forem kyslíku (ROS) nebo kontrole metabolismu mastných kyselin a glukózy [Busiello et al., 2015]. Mitochondriální matrix je sídlem mnoha procesů intermediárního metabolismu, zejména oxidace mastných kyselin, dekarboxylace pyruvátu nebo Krebsova cyklu. Mitochondrie jsou nejvýznamnějším buněčným zdrojem reaktivních forem kyslíku (ROS), které se vedle své fyziologické role signálních molekul považují za jeden z hlavních faktorů přispívajících ke stárnutí a vzniku mnoha patologických stavů [Rossmann et al., 2021].



Obrázek 4 – Přehled mitochondriálních funkcí s uvedením souvisejících proteinů, markerů, metabolitů a kaskád

ATP = adenosintrifosfát; ETS = mitochondriální elektrontransportní systém; Bcl2 = B-cell lymfoma 2; EndoG = endonukleáza G; cyt c = cytochrom C; Casp9 = kaspáza 9; UCP1 = z anglického uncoupling protein 1; Ca^{2+} = vápenaté kationty; MCU = mitochondriální vápníkový přenašeč, z anglického mitochondrial calcium uniporter; NCLX = z anglického $Na^{+}/Ca^{2+}/Li^{+}$ exchanger; FAO = oxidace mastných kyselin, z anglického fatty acid oxidation; PDH = pyruvátdehydrogenáza; Drp1 = z anglického dynamin related protein 1; Mfn1/2 = mitofusiny; SOD = superoxiddismutáza; CCP = cytochrom C peroxidáza; SIRT = sirtuiny; MAVS = z anglického mitochondrial antiviral-signaling protein; COX5B = cytochrom C oxidáza, podjednotka 5B; ROS = reaktivní formy kyslíku, z anglického reactive oxygen species. Obrázek autora.

Krebsův cyklus

Cyklus trikarboxylových kyselin (TCA), případně cyklus kyseliny citronové, představuje klíčovou metabolickou dráhu v mitochondriích eukaryotických buněk. Primární funkcí TCA cyklu je tvorba redukovaných koenzymů NADH (nikotinamidadenindinukleotid) a $FADH_2$ (redukovaná forma flavinadenindinukleotidu), které slouží jako zdroje elektronů pro elektrontransportní systém (ETS) cestou postupné oxidace acetyl-CoA na CO_2 (obrázek 5). Každá „otočka" TCA generuje 3 molekuly NADH, 1 $FADH_2$, 1 GTP (guanosintrifosfát) a 2 molekuly CO_2. Vedle přeměny energie poskytuje TCA cyklus klíčové prekurzory pro biosyntetické dráhy. Meziprodukty cyklu, jako jsou α-ketoglutarát a oxalacetát, slouží k syntéze aminokyselin, zatímco citrát může být transportován do cytosolu, kde se podílí na syntéze lipidů a nukleotidů. Kromě metabolismu ovlivňují acetyl-CoA, α-ketoglutarát, fumarát a sukcinát také imunitní reakce a epigenetické mechanismy. Základní funkce TCA cyklu je ovšem těsně propojena s ETS a oxidační fosforylací, čímž umožňuje tvorbu ATP [Martínez-Reyes a Chandel, 2020].

Mitochondriální elektrontransportní systém (ETS)

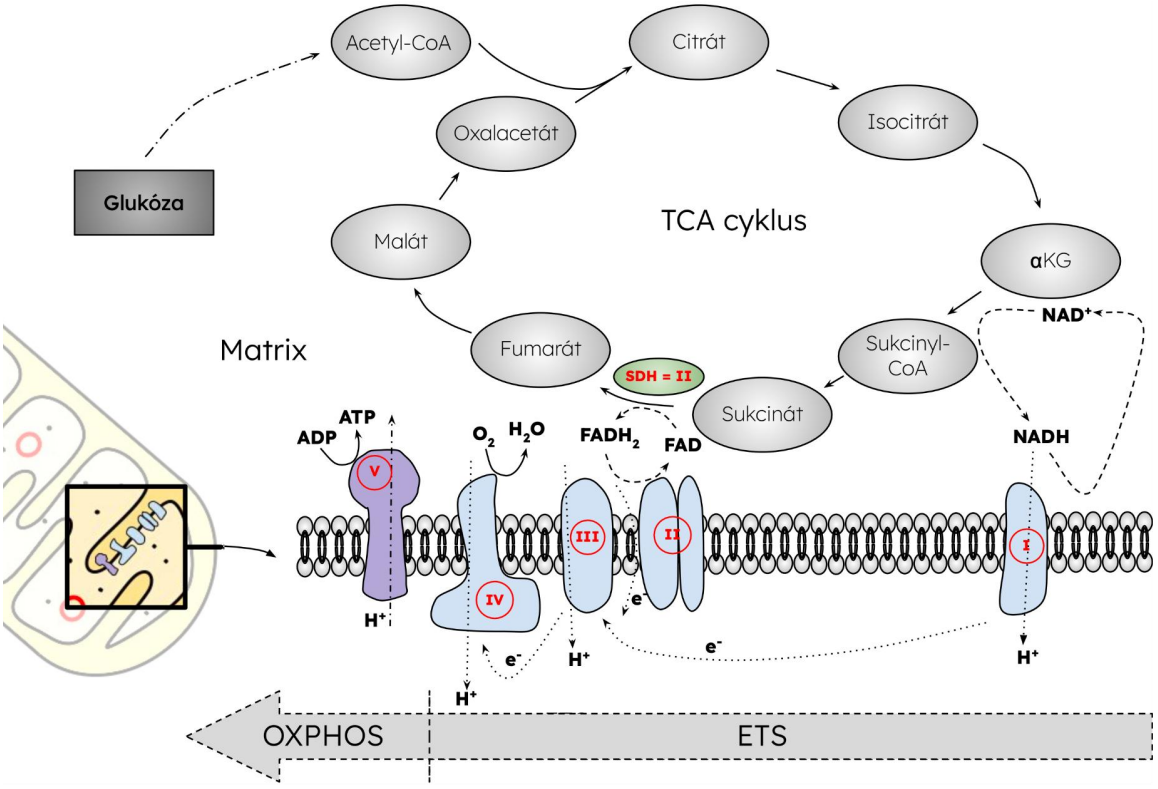
Mitochondriální systém transportu elektronů, který se zastarale označuje jako dýchací řetězec (ve skutečnosti je v sérii uspořádána jen část systému), se skládá ze 4 mnohajednotkových integrálních proteinů ve vnitřní mitochondriální membráně. Nedílnou součástí celého systému jsou 2 mobilní přenašeče elektronů, koenzym Q a cytochrom c (obrázek 5). Efektivita systému je zesilována tvorbou tzv. superkomplexů s různým zastoupením jednotlivých respiračních komplexů [Schägger, 2001]. Kromě přenosu elektronů fungují respirační komplexy jako protonové pumpy, které přesouvají H^+ do mezimembránového prostoru a vytváří tak mitochondriální membránový potenciál (protonový gradient) [Alberts, 1998].

Komplex I (NADH ubichinon-oxidoreduktáza, NADH-dehydrogenáza typu I) je nejsložitějším komplexem celého systému. U savců se skládá ze 45 podjednotek, z nichž je 7 kódováno mitochondriální DNA. Elektrony získává z NADH a přenáší je na mobilní nosič ubichinon (koenzym Q), čímž vzniká redukovaný ubichinol (QH_2). Kromě toho přenáší komplex I čtyři protony do mezimembránového prostoru. Komplex I je také významným zdrojem ROS, včetně superoxidu, k jehož vzniku dochází únikem elektronů z respiračního systému [Parey et al., 2020].

Komplex II (sukcinátdehydrogenáza nebo sukcinát-CoQ-reduktáza) se skládá jen ze 4 podjednotek, které jsou všechny kódovány jadernou DNA. Má dvojí funkci: je součástí Krebsova cyklu, kde oxiduje sukcinát na fumarát a dva získané elektrony přenáší přes $FADH_2$ na ubichinon. Komplex II netranslokuje žádné protony do mezimembránového prostoru [Bezawork-Geleta et al., 2017].

Komplex III (komplex cytochrom bc1 nebo CoQH2-cytochrom c reduktáza) má 11 podjednotek, z nichž jen jedna je kódována mitochondriální DNA. Komplex III přebírá elektrony od koenzymu Q a složitým tzv. Q-cyklem je předává cytochromu c, dalšímu mobilnímu elementu respiračního systému. Přenosem 2 elektronů na cytochrom c přesouvá čtyři protony do mezimembránového prostoru. Při sníženém přenosu elektronů horizontálně dochází k jejich úniku na molekulární kyslík za vzniku superoxidu [Crofts, 2004].

Komplex IV (cytochrom c oxidáza) je poslední enzym mitochondriálního ETS. Má 14 podjednotek, 3 z nich jsou kódovány v mitochondriích. Katalyzuje postupný přenos 2 elektronů z cytochromu c na molekulární kyslík za vzniku molekuly vody a tepla. Z matrix ubydou celkem 4 H^+, 2 jsou translokovány do intermebránového prostoru, vytváří protonový gradient a 2 reagují s kyslíkem. Cytochrom c oxidáza je také hlavním regulátorem rychlosti ETS, její aktivita se přizpůsobuje dostupnosti kyslíku a energetickým požadavkům buňky, zároveň chrání buňku před oxidačním stresem, respektive protektivně vstupuje do procesu tvorby ROS [Brischigliaro a Zeviani, 2021].



Obrázek 5 – Krebsův cyklus a elektrontransportní systém (ETS)
OXPHOS = oxidační fosforylace; NAD^+/NADH = nikotinamidadenindinukleotid (oxidovaná a redukovaná forma); FAD/$FADH_2$ = flavinadenindinukleotid (oxidovaná a redukovaná forma); e^- = elektron; H^+ = vodíkový proton; I, II, III, IV = respirační komplexy I–IV; V = ATP syntáza; Acetyl-CoA = acetylkoenzym A; citrát, isocitrát, αKG (α-ketoglutarát), sukcinyl-CoA, sukcinát, fumarát, malát, oxalacetát = meziprodukty Krebsova cyklu; ATP = adenosintrifosfát; ADP = adenosindifosfát; SDH (II) = sukcinátdehydrogenáza, respirační komplex II.
Převzato a upraveno dle Martínez-Reyes a Chandel, 2020.

2 Stárnutí a syndrom demence – praktická část

2.1 Cíle práce

Prvním cílem práce bylo zjistit prevalenci měřitelného kognitivního deficitu u subpopulace zdatných a nezávislých seniorů starších 70 let při využití testu MoCA (Montrealský kognitivní test, z anglického Montreal Cognitive Assessment). Zároveň bylo záměrem zajistit kontrolní skupinu kognitivně zdravých pro další cíle práce.

Druhým cílem dizertační práce bylo porovnat mitochondriální respiraci intaktních a permeabilizovaných trombocytů a produkci ATP u mladších (20–42 let) a starších zdravých jedinců (70–89 let).

Třetím cílem bylo stanovit vliv syndromu demence (bez ohledu na etiologii) na mitochondriální respirační parametry, a to v porovnání se zdravými probandy podobného věku a také se soběstačnými seniory, kteří trpí běžnými chronickými nemocemi ve stáří, např. srdečním selháním, diabetem, onemocněními pohybové soustavy aj.

Čtvrtým cílem bylo stanovit mitochondriální respirační parametry v tkáních a orgánech (hipokampu, mozečku, myokardu, kosterním svalu, játrech, kůře ledvin a trombocytech) transgenního potkana s geneticky indukovaným modelem Alzheimerovy choroby TgF-344 AD, a to ve věku 6, 12 a 24 měsíců.

2.2 Hypotézy

1. V populaci zdatných a nezávislých seniorů nad 70 let je relativně nízká prevalence (do 20 %) klinicky měřitelné kognitivní dysfunkce při použití běžného screeningového testu (MoCA).

2. Mitochondriální respirace lidských trombocytů s rostoucím věkem klesá.

3. Demence jakéhokoliv původu má negativní vliv na mitochondriální respiraci trombocytů.

4. Alzheimerova choroba je doprovázena dysfunkcí mitochondrií nejen v CNS, ale i v periferních orgánech a trombocytech.

2.3 Metody

2.3.1 Metody vztahující se k cíli 1

Dobrovolníci

Dobrovolníci z řad seniorů ve věku 70 až 95 let byli získáváni na Univerzitě třetího věku LF UK v Plzni, v okruhu zdravých příbuzných pracovníků laboratoře a přátel a Geriatrického oddělení Fakultní nemocnice Plzeň (N = 81). Z celkového počtu anamnesticky kognitivně zdravých dobrovolníků bylo z dalšího testování vyřazeno 11 osob. Jeden dobrovolník byl vyloučen pro užívání memantinu, přestože u něj nebyl jednoznačně diagnostikovaný syndrom demence. Dalších 10 dobrovolníků z Geriatrického oddělení FN Plzeň bylo vyřazeno kvůli fyzické inaktivitě způsobené nucenou imobilizací na lůžku v důsledku traumatu nebo jiného onemocnění vyžadujícího hospitalizaci. Hospitalizovaní pacienti tedy byli nakonec kompletně vyloučeni ze souboru vztahujícího se k cíli 1. Dalších 70 dobrovolníků (skupina označena jako ST) podstoupilo test MoCA a test fyzické zdatnosti SPPB (z anglického Short Physical Performance Battery). Tato skupina dobrovolníků byla označena jako ST a byla dále rozdělena podle výsledků kognitivního testu a přidružených významných komorbidit (podrobněji viz v kapitole 2.4.1). Od všech účastníků byla odebrána anamnéza včetně farmakologické a osobní. Účastníci byli požádáni o základní biochemický a hematologický screening. Všichni vybraní senioři se sami hodnotili jako soběstačtní a velká většina jako aktivní osoby.

Montrealský kognitivní test

Screeningový test kognitivních funkcí MoCA byl hodnocen u vybraných 70 dobrovolníků. Byly využity obě dostupné a v ČR validované formy (MoCA-CZ1 a MoCA-CZ2), které jsou ekvivalentní [Fayette, 2016]. Testuje se 8 domén kognice (zrakově-prostorové schopnosti, exekutivní funkce, pojmenování, pozornost, řeč, abstrakce, paměť a orientace) [Nasreddine et al., 2005]. Byla provedena doporučená korekce na vzdělání (1 bod navíc přidělen seniorům s délkou vzdělání 10–12 let, 2 body navíc přiděleny seniorům s délkou vzdělání 4–9 let). Maximum bodů, které lze získat je 30. Hodnota ≥ 26 byla stanovena jako hraniční skór pro posouzení dobrovolníka jako kognitivně zdravého. Obě formy MoCA viz v příloze.

Mini-Mental State Examination (MMSE)

Všeobecně známý kognitivní test MMSE je široce využíván v klinické praxi. V našem souboru byl hodnocen u 56 pacientů jako doplňkový test. Výběr testovaných byl náhodný. Je vhodný k detekci syndromu demence [Anthony

et al., 1982], naopak málo senzitivní k odhalení MCI [Nasreddine et al., 2005]. Maximem je opět 30 dosažených bodů. Hodnotí se orientace, pozornost, paměť, vizuálně-prostorové schopnosti, porozumění, řeč a exekutivní funkce. Hraniční hodnota byla zvolena dle Bartoše a Raisové, aby byl zohledněn i záchyt mírné kognitivní poruchy, tj. při skóru ≤ 27 bodů je u dobrovolníka měřena kognitivní dysfunkce [Bartoš a Raisová, 2016].

SPPB

Krátká baterie pro testování fyzické zdatnosti seniorů obsahuje hodnocení 3 funkčních oblastí, z nichž v každé je možné skórovat 0–4 body. Maximální možné množství dosažených bodů je 12. Jako dobrá fyzická zdatnost je hodnocen výsledek 10–12, jako snížená fyzická zdatnost je hodnocen výsledek 7–9 bodů a skór 0–6 bodů značí vysoké riziko budoucí nesoběstačnosti [Guralnik et al., 1994; Berková et al., 2013]. Dotazník je součástí příloh disertační práce.

Kromě SPPB testu byla členy výzkumného týmu orientačně vyhodnocena aktivita dobrovolníka na základě anamnézy. Byly stanoveny 3 kategorie – aktivní, středně aktivní a neaktivní. Jako aktivní senior byl hodnocen ten, který alespoň 2x týdně vykonává aerobní aktivitu v délce minimálně 60 minut a/nebo silový trénink v délce 30 minut, zároveň je sociálně činný a zajímá se o okolní dění. Jako středně aktivní senior byl hodnocen ten, který provozuje aktivity nad základní rámec soběstačnosti v běžných i instrumentálních denních aktivitách a jako neaktivní byli hodnoceni ti senioři, kteří jsou soběstační, ale žijí především sedavým způsobem života.

2.3.2 Metody vztahující se k cílům 2 a 3

Pacienti a dobrovolníci

Kontrolní skupina mladých dobrovolníků (věk 20 až 42 let; ML; N = 44) byla získána z Transfuzního oddělení FN v Plzni nebo mezi pracovníky laboratoře. U ML byly standardními laboratorními metodami stanoveny základní hematologické parametry (počet bílých krvinek (WBC), počet červených krvinek (RBC), koncentrace hemoglobinu v krvi (Hb) a počet krevních destiček (PLT)).

Skupina starších, kognitivně zdravých dobrovolníků byla označena jako ST1 a vzešla z kognitivního testování skupiny ST v rámci cíle 1 dle popsané metodologie (N = 42). Ze skupiny ST1 byla dále selektována skupina ST1A (N = 13), u které bylo minimalizováno riziko ovlivnění mitochondriálních funkcí

sekundárními vlivy, aby co nejvěrněji reprezentovala normální stárnutí. Vyloučeni byli dobrovolníci s anamnézou hyper- nebo hypotyreózy, diabetem, srdečním selháním, ischemickou chorobou srdeční, depresivní poruchou, anamnézou infekčního onemocnění včetně běžných viróz v posledních 3 týdnech a infekcí vyžadujících podání antibiotik v posledních 2 měsících před odběrem krve, hlubokou žilní trombózou nebo plicní embolií v anamnéze, kombinovanou medikací s více než třemi farmaky a některými konkrétními léky, které mohou interferovat s funkcí mitochondrií (např. statiny ve vyšší dávce nebo metformin nebo warfarin) [Vuda a Kamath, 2016; Bețiu et al., 2022]. Většina dobrovolníků dodala výsledky krevního obrazu a základního biochemického screeningu. Jedna dobrovolnice byla vyloučena na základě signifikantně zvýšeného CRP (C-reaktivní protein). Pouze 4 vybraní dobrovolníci ve skupině ST1A neužívali chronickou medikaci. Užívání rosuvastatinu v malé dávce bylo tolerováno, neboť mitochondriální respiraci trombocytů neovlivňuje [Vevera et al., 2016]. Charakteristika účastníků studie ze skupiny ST1A je uvedena v tabulce 1.

Skupina pacientů s klinicky vyjádřeným syndromem demence (věk 70 až 96 let; DEM; N = 16) byla získána na Geriatrickém oddělení FN Plzeň nebo z ambulance téhož oddělení. Mezi DEM byli zařazeni také 2 nemocní ze skupiny ST, kteří byli dovyšetřeni na geriatrické ambulanci se stanovenou diagnózou. Etiologická diferenciace demence lékařem nicméně nebyla vyžadována, proběhla pouze u některých pacientů. Syndrom demence byl konstatován na základě standardních kritérií [McKhann et al., 2011]. Celkově byla akceptována v zásadě neselektovaná populace s cílem zajistit vzorek, který realisticky odráží pacienty s již jednoznačně vyjádřenou demencí, tj. nebyla využita vylučovací kritéria jako u dobrovolníků ST1A, např. polypragmazie, diabetes apod. Základní charakteristiky souboru DEM a kontrolní skupiny ST1 jsou uvedeny v tabulce 2.

Všem uvedeným skupinám byla standardním způsobem odebrána nesrážlivá krev k analýze mitochondriální respirace trombocytů.

Studie (Metody vztahující se k cílům 1, 2 a 3) byla schválena Společnou etickou komisí LF a FN v Plzni č.j. 452-18 a byla provedena v souladu s Helsinskou deklarací. Od všech subjektů byl získán písemný informovaný souhlas.

Tabulka 1 – Charakteristika účastníků studie (ML a ST1A)

	ML	ST1A	p
N	44	13	n.d.
Muži/Ženy	27/17	2/11	n.d.
Věk	30,7 ± 6,2	73,6 ± 3,5	< 0,01
Medikace (systémová)	0	2x vitamin D, 2x kalcium, 1x magnesium, 1x kyselina acetylsalicylová, 1x inhibitor ACE (perindopril), 2x sartan (valsartan, telmisartan), 1x metylprednisolon (4 mg/den), 2x antihistaminika 2. generace (loratadin, levocetirizin), 1x bisfosfonát (ibandronát), 1x β1-selektivní betablokátor (nebivolol), 1x prokinetikum (itoprid), 1x inhibitor protonové pumpy (omeprazol), 1x statin (rosuvastatin - 5 mg/den), 2x hydrochlorothiazid, 1x blokátor kalciového kanálu (lerkanidipin)	n.d.
Leukocyty ($\cdot 10^9 \cdot l^{-1}$)	6,3 ± 1,1	7,6 ± 3,4	n.d.
Erytrocyty ($\cdot 10^{12} \cdot l^{-1}$)	5,2 ± 0,2	4,6 ± 0,4	< 0,01
Hemoglobin ($g \cdot l^{-1}$)	151 ± 9	139 ± 10	< 0,01
Trombocyty ($\cdot 10^9 \cdot l^{-1}$)	224 ± 41	287 ± 101	n.d.
Glukóza ($mmol \cdot l^{-1}$)	n.d.	5,3 ± 1,1	n.d.
CRP ($mg \cdot l^{-1}$)	n.d.	3,25 ± 3,26	n.d.
SPPB	n.d.	11,8 ± 0,6	n.d.
MoCA	n.d.	28,1 ± 1,4	n.d.

ML = mladší účastníci; ST1A = starší kognitivně intaktní účastníci bez významné osobní a lékové anamnézy; CRP = C-reaktivní protein (koncentrace v plazmě); SPPB = Short Physical Performance Battery test (maximální skór 12); MoCA = Montrealský kognitivní test, z anglického Montreal Cognitive Assessment (maximální skór 30); n.d. = nestanoveno; n.s. = nesignifikantní rozdíl.

Tabulka 2 – Charakteristika účastníků studie (DEM a ST1)

	DEM	ST1	p
N	16	42	n.d.
Muži/Ženy	6/10	4/38	n.d.
Věk	83,5 ± 7	74,7 ± 3,6	< 0,01
Medikace (systémová) – počet užívaných léků	7,4 ± 2,8	4,1 ± 2,8	< 0,01
MMSE	17,8 ± 3,6	29,1 ± 1,2	< 0,01
SPPB	n.d.	11,3 ± 1,8	n.d.
MoCA	n.d.	28 ± 1,4	n.d.
Etiologie demence (diferenciální diagnostika lékařem)	7x AD 9x neurčená nebo smíšená	n.d.	n.d.

DEM = pacienti se syndromem demence; ST1 = kognitivně zdraví dobrovolníci; MMSE = Mini-Mental State Examination (maximální skór 30); SPPB = Short Physical Performance Battery test (maximální skór 12); MoCA = Montrealský kognitivní test, z anglického Montreal Cognitive Assessment (maximální skór 30); n.d. = nestanoveno; n.s. = nesignifikantní rozdíl.

Chemikálie a roztoky

Pokud není uvedeno jinak, všechny použité chemikálie byly zakoupeny v analytické čistotě od společnosti Merck (Sigma-Aldrich; Praha, Česká republika).

A. Prokainový roztok na počítání trombocytů obsahoval 86 $mmol \cdot l^{-1}$ hydrochloridu prokainu a 34 $mmol \cdot l^{-1}$ NaCl v destilované vodě.
B. Roztoky určené pro měření mitochondriálních funkcí vysoce účinnou respirometrií a pomocí metabolického analyzátoru Seahorse:
    a. Respirační médium pro vysoce účinnou respirometrii permeabilizovaných trombocytů MIR05 se skládalo z: 0,5 $mmol \cdot l^{-1}$ EGTA; 3 $mmol \cdot l^{-1}$ $MgCl_2 \cdot 6H_2O$; 60 $mmol \cdot l^{-1}$ laktobionátu draselného; 20 $mmol \cdot l^{-1}$ taurinu; 10 $mmol \cdot l^{-1}$ KH_2PO_4; 20 $mmol \cdot l^{-1}$ HEPES; 110 $mmol \cdot l^{-1}$ sacharózy; 1 $g \cdot l^{-1}$ hovězího albuminu bez mastných kyselin; pH 7,0 [Pesta a Gnaiger, 2012].
    b. Respirační médium pro vysoce účinnou respirometrii intaktních trombocytů a pro analýzu respirace v analyzátoru Seahorse PBSG (z anglického phosphate buffered saline with glucose) obsahovalo: 7,5 $mmol \cdot l^{-1}$ $Na_2HPO_4 \cdot 7H_20$; 2,5 $mmol \cdot l^{-1}$ $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$, 137 $mmol \cdot l^{-1}$ NaCl; 2,7 $mmol \cdot l^{-1}$ KCl a 10 $mmol \cdot l^{-1}$ glukózy.

c. Médium pro stanovení produkce ATP v analyzátoru Seahorse se skládalo z média Seahorse XF DMEM Medium® (Agilent Technologies) s přidanou glukózou (5,5 $mmol \cdot l^{-1}$), glutaminem (4 $mmol \cdot l^{-1}$) a pyruvátem (1 $mmol \cdot l^{-1}$); pH 7,4.

C. Corning® Cell-Tak™ je tkáňové a buněčné lepidlo, které se používá k přichycení buněk na dno jamek destiček analyzátoru Seahorse. Do jedné jamky se pipetuje 25 µl roztoku, který obsahuje 2,8 µl Cell-Tak™, 1,4 µl NaOH 1 $mol \cdot l^{-1}$ a 240 µl $NaHCO_3$ 100 $mmol \cdot l^{-1}$. Po 20minutové inkubaci v termostatu při 37 °C se destička vylije, dvakrát promyje destilovanou vodou a nechá vyschnout.

D. PBS (fosfátový pufr, z anglického Phosphate Buffered Saline) na promývání trombocytů obsahoval: 7,2 $mmol \cdot l^{-1}$ $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$; 3,2 $mmol \cdot l^{-1}$ $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$, 120 $mmol \cdot l^{-1}$ NaCl a 2,7 $mmol \cdot l^{-1}$ KCl, pH 7,2.

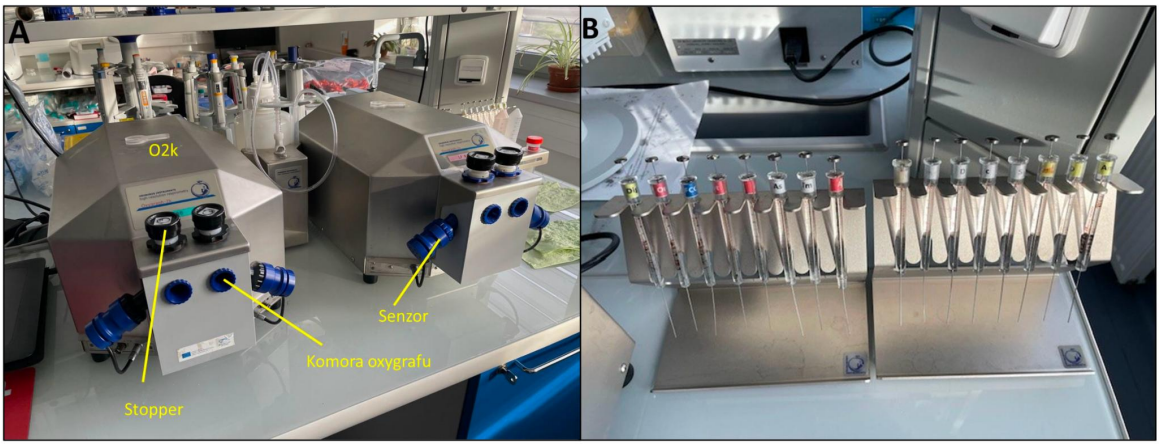
Izolace a počítání trombocytů

Lidská nesrážlivá krev odebraná v objemu 27 ml do zkumavek s protisrážlivým prostředkem K_3EDTA (zkumavky pro odběr krve Vacuette® – Dialab, Praha, Česká republika) byla opatrně přelita do 50mililitrových zkumavek typu Falcon (P-lab, Praha, Česká republika) a promíchána s 62,5 ng/ml prostaglandinu E1, který inhibuje aktivaci trombocytů [Becker et al., 1972]. Krev pak byla centrifugována po dobu 20 minut v pokojové teplotě při odstředivém zrychlení 300·g. Získaná plasma bohatá na trombocyty byla následně přepipetována do nových zkumavek, smíchána s PBS v poměru 1:1 a opět centrifugována po dobu 10 minut, pokojové teplotě a 1500·g. Po odstranění supernatantu byl sediment trombocytů resuspendován v konečném médiu, tedy v MIR05 na měření mitochondriální respirace v permeabilizovaných krevních destičkách a v PBSG pro hodnocení spotřeby kyslíku intaktními trombocyty. Z připravených suspenzí trombocytů byly odebrány vzorky 25 µl do skleněné nádobky a smíchány s 475 µl prokainového roztoku, jehož vlivem dojde k optickému zvýraznění a zaoblení okraje destičky a útlumu jejího metabolismu. Po 10minutové inkubaci se trombocyty počítají ve 20 malých obdélnících Bürkerovy komůrky při 200násobném zvětšení. Počet trombocytů v 1 litru suspenze se stanovil podle rovnice:

- Počet trombocytů v 1 l = $5 \cdot 10^7 \cdot 20 \cdot$počet trombocytů v 20 obdélnících. Konečný počet destiček byl upraven na $150–350 \cdot 10^9 \cdot l^{-1}$.

Analýza mitochondriální respirace – respirometrie s vysokým rozlišením (O2k, vysoce účinná respirometrie, HRR, z anglického high-resolution respirometry)

Metody vhodné pro hodnocení mitochondriální spotřeby kyslíku jsou založeny na principu Clarkova senzoru. Jedná se o elektrolytický článek, ve kterém dochází k difuzi kyslíku z média přes polopropustnou membránu ke zlaté katodě, na kterou je přivedeno rozkladné napětí pro kyslík, jenž se na elektrodě redukuje. Elektrony potřebné pro redukci kyslíku se získávají na stříbrné anodě a článkem teče proud úměrný koncentraci kyslíku. Ve srovnání s klasickou oxygrafií je respirometrie metoda založená na podobném principu, ale technickými úpravami dosáhla značného zvýšení citlivosti, a tím umožnila měření poklesu koncentrace kyslíku v utěsněné komůrce s velmi malými vzorky tkání (řádově mg) a po dlouhou dobu (desítky minut). Respirometrie byla vyvinuta v 90. letech 20. století prof. Gnaigerem v rakouském Innsbrucku (oxygraf O2k, Oroboros Instruments, Innsbruck, Rakousko). Zvětšením plochy zlaté katody a udržováním teploty v úzce ohraničených mezích (± 0,001 °C) je zvýšena citlivost senzoru tak, že může detekovat koncentraci O_2 až 5 nmol·l^{-1} a změnu koncentrace O_2 až 1 pmol/s/ml. Další vylepšení zahrnují použití materiálů s minimální propustností pro kyslík na konstrukci komůrky, senzorů, míchadel, uzávěrů (stopperů) a těsnění. Každý oxygraf je vybaven 2 komůrkami o kalibrovatelném objemu 2 ml a elektronickou kontrolou teploty pomocí Peltierova článku [Gnaiger, 2008]. Mitochondriální laboratoř na LF UK v Plzni je vybavena 4 respirometry O2k, což umožňuje zpracování až 16 různých vzorků v průběhu 1 pracovního dne (obrázek 6).



Obrázek 6 – Oxygraf O2k (A) a sada titračních Hamiltonových stříkaček používaná na aplikaci vzorků a chemikálií do komůrek oxygrafů (B)

Respirometr zaznamenává koncentraci kyslíku v utěsněné komůrce. Po vložení analyzované tkáně klesá koncentrace O_2 úměrně spotřebě kyslíku vzorkem. Rychlost poklesu se pomocí záporně vzaté derivace změny koncentrace simultánně zaznamenává pomocí programu DatLab (verze 6 a 7; Oroboros Instruments, Innsbruck, Rakousko) a vyjadřuje se jako spotřeba O_2 na ml média nebo na mg vlhké tkáně, případně na počet buněk v 1 ml média (obrázek 7 – vzorové respirometrické křivky).

Respirační stavy stanovené HRR

Klasické mitochondriální respirační stavy byly definovány Chancem a Williamsem [1955a; 1955b] na základě spotřeby kyslíku izolovanými mitochondriemi podle hladiny ADP, substrátů, rychlosti respirace a limitujících faktorů rychlosti spotřeby kyslíku. S novými poznatky o mitochondriální fyziologii byly tyto stavy postupně rozšiřovány a detailněji specifikovány, ale přesto byl jejich systém zdrojem určitých nedorozumění, která vyžadovala další rozšíření oxygrafické mitochondriální terminologie [Gnaiger, 2014]. Profesor Erich Gnaiger na začátku 21. století postupně vyvinul novou terminologii [Pesta a Gnaiger, 2012], která se v současné odborné literatuře stále více používá (obrázek 7).

Mitochondriální respirace se experimentálně analyzuje na izolovaných mitochondriích, které se získávají homogenizací a postupnou centrifugací vzorků tkáně. Nevýhodou je, že izolační postup může odstranit poškozené, ale stále ještě funkční mitochondrie a zkreslovat tak výsledky měření. Další možností je permeabilizace tkání a buněk mechanicky nebo chemicky. Ta umožní přístup saturujících koncentrací substrátů k mitochondriím všech kvalit. Nevýhodou může být nedostatečná nebo naopak nadměrná permeabilizace, která rozruší i jiné membrány než buněčné. Izolované mitochondrie a permeabilizované tkáně a buňky se testují v médiích, které svým složením napodobují intracelulární tekutinu.

Na permeabilizovaných vzorcích tkání/buněk nebo izolovaných mitochondriích lze stanovit následující základní stavy:

LEAK – spotřeba kyslíku nezbytná pro udržení mitochondriálního membránového potenciálu, který vzniká přenosem protonů do mezimembránového prostoru. Je tím vyšší, čím větší je náhodný nebo řízený únik protonů, skluz protonů z respiračních komplexů, únik elektronů a přesun kationtů, zejména Ca^{2+} přes vnitřní mitochondriální membránu. Lze jej navodit buď přidáním substrátů přinášejícím elektrony k respiračnímu systému. V situaci aplikace mastných kyselin se označuje LEAK-FAO, při inhibici ATP-syntázy oligomycinem LEAK-OMY.

OXPHOS – kapacita spotřeby kyslíku jedné nebo více cest elektrontransportního systému probíhající při současné fosforylaci. Lze jej navodit přidáním ADP buď po předchozí aplikaci palmitoylkarnitinu nebo jiné mastné kyseliny navázané na karnitin, jenž ji dopraví do mitochondrie (stav OXPHOS-FAO), nebo po přidání substrátů, jež přinášejí elektrony ke komplexu I – malátu, glutamátu a pyruvátu (OXPHOS-I), nebo po aplikaci sukcinátu, substrátu komplexu II (OXPHOS-II), nebo jejich kombinací.

ETSC – respirační kapacita elektrontransportního systému po odpojení oxidace od fosforylace protonoforem, nejčastěji FCCP (karbonylkyanid-p-trifluorometoxy -fenylhydrazon), jenž umožní únik protonů z mezimembránového prostoru, způsobí kolaps mitochondriálního membránového potenciálu a fosforylace není nadále možná. Bývá vyšší než odpovídající stav OXPHOS, zejména v těch tkáních, kde je transport elektronů zpětně kontrolován fosforylací. Označuje se podle přidaných substrátů, v této práci ETSC-FAO+I+II a ETSC-II (EII).

ROX – reziduální spotřeba kyslíku, zejména nemitochondriální ve vzorcích tkání a buněk nebo mitochondriální mimo elektrontransportní systém v izolovaných mitochondriích. Navozuje se aplikací antimycinu A, inhibitoru komplexu III, jenž systém zcela zablokuje. Hodnota ROX se obvykle odečítá od ostatních respiračních stavů, aby nebyly zkresleny spotřebou kyslíku mimo elektrontransportní systém.

CIV – stav odpovídající aktivitě komplexu IV, jenž přenáší elektrony na molekulární kyslík. Obvykle se stanovuje po aplikaci antimycinu A, kdy v celém respiračním systému zůstává funkční jen komplex IV, ale k jeho analýze je třeba dodat umělý substrát, protože přirozenou cestou z komplexu III se k němu elektrony nedostanou. Tímto substrátem je TMPD (tetrametyl-p-fenylendiamin), který však podléhá silné autooxidaci a je nezbytné jej aplikovat společně s kyselinou askorbovou a od získané hodnoty odečíst spotřebu kyslíku po aplikaci azidu sodného, inhibitoru komplexu IV.

V intaktních buňkách pak lze stanovit stavy ROUTINE, LEAK, ETSC a ROX.

ROUTINE (ROUT, R) – bazální spotřeba kyslíku intaktními buňkami v médiu, které má podobné charakteristiky jako extracelulární tekutina nebo je to přímo plazma. Je to stav, který nejvíce odpovídá situaci in vivo, i když jej lze významně ovlivnit přídavkem substrátů metabolických cest, které v buňce přeměňují energii živin na ATP.

LEAK (L) – stav odpovídající stavu LEAK po přidání oligomycinu v permeabilizovaných tkáních. Oligomycin proniká biologickými membránami

a inhibuje ATP-syntázu. Spotřeba kyslíku pak odpovídá potřebě buňky udržet mitochondriální membránový potenciál – systémem se přenáší jen tolik elektronů, kolik je třeba pro kompenzaci úniku protonů a elektronů z respiračního systému a pumpování odpovídajícího množství protonů do mezimembránového prostoru.

ETSC (E) – respirační stav odpovídající kapacitě elektrontransportního systému v podmínkách in vivo, tj. bez přídavku saturujících koncentrací jednotlivých substrátů. Stejně jako v permeabilizovaných tkáních se navozuje titrací vybraného protonoforu.

ROX – reziduální spotřeba kyslíku po inhibici komplexu III antimycinem A, případně i komplexu I rotenonem.

CIV – s určitými výhradami lze v intaktních buňkách také stanovit respirační aktivitu komplexu IV po aplikaci TMPD, který se do mitochondrií dostává difuzí přes membrány. Membrány buněk jsou však téměř nepropustné pro askorbát, a tak může autooxidace dosahovat vyšších hodnot než v permeabilizovaných buňkách a tkáních.

Vypočtené stavy a poměry [Gnaiger, 2014]:

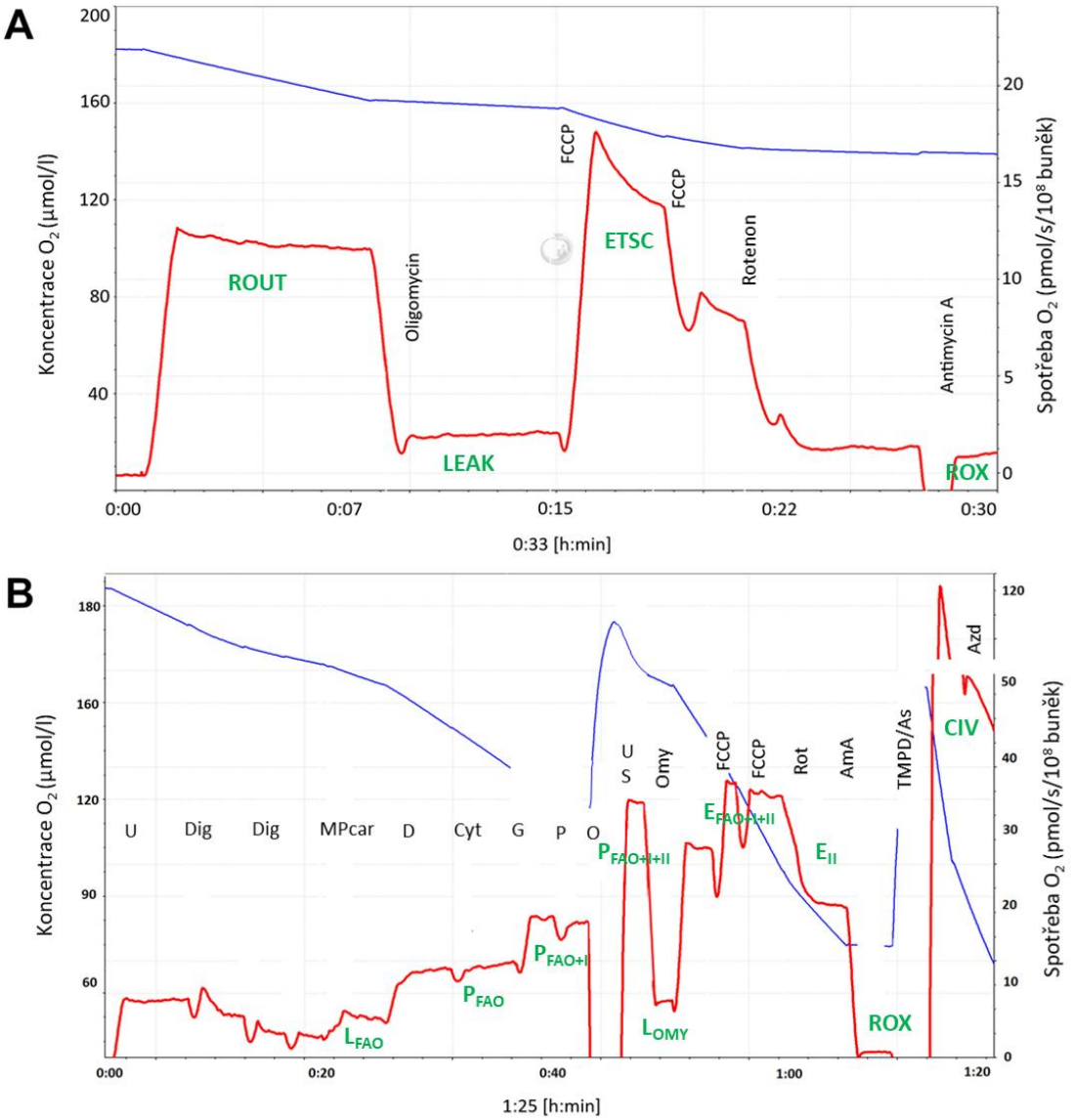
R-L – bazální spotřeba kyslíku korigovaná na stav LEAK. Jedná se o respirační kapacitu dostupnou pro přeměnu ADP na ATP.

E-R – rezervní kapacita elektrontransportního systému teoreticky dostupná pro využití na fosforylaci při zvýšení metabolických nároků buňky.

L/E – poměr kontroly spřažení oxidace a fosforylace kontrolovaný vlastním spřažením a kapacitou elektrontransportního systému. Zvyšuje se (tj. spřažení obou procesů se snižuje) při zvýšeném úniku protonů přes vnitřní mitochondriální membránu a při snížení kapacity ETS.

L/R – indikátor spřažení fosforylace a oxidace při bazální respiraci, který je kontrolován fyziologickým potřebou energie v buňce, mitochondriálním spřažením a oxidační fosforylací.

R/L – obdobný stav, který udává, kolikrát bazální respirace převyšuje stav LEAK a je relativním ukazatelem bazální fyziologické respirace vztažené k produkci ATP.

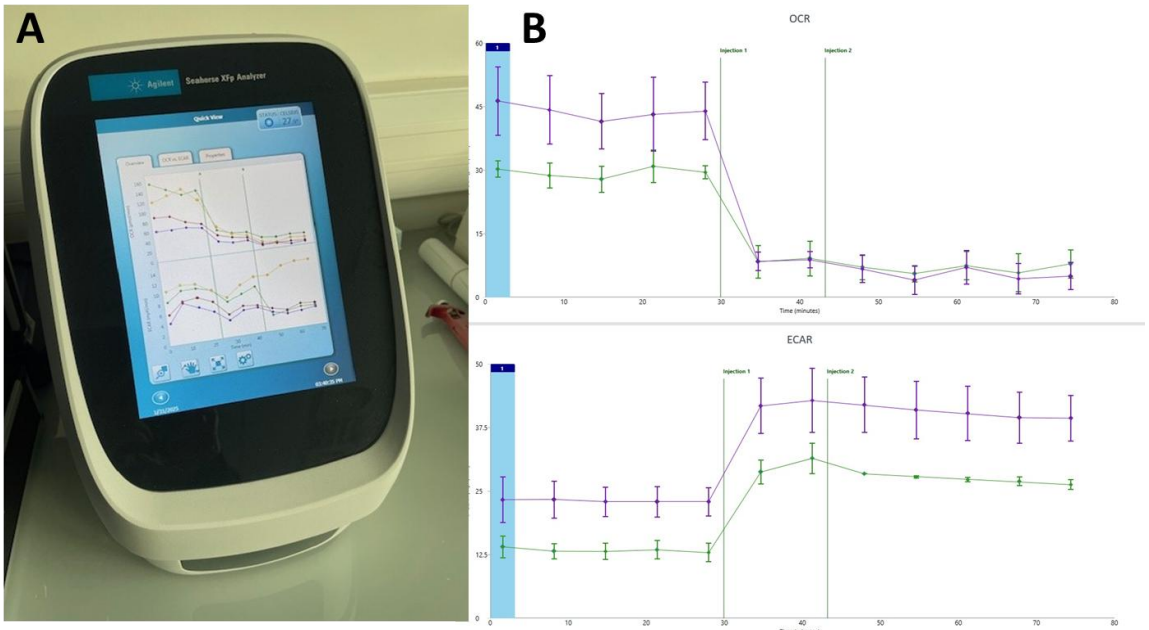


Obrázek 7 – Vzorové respirometrické křivky spotřeby kyslíku trombocyty v oxygrafu O2k pro intaktní (A) a permeabilizované trombocyty (B)

Červená čára – rychlost spotřeby kyslíku; modrá čára – koncentrace kyslíku v komůrce oxygrafu. ROUT = bazální spotřeba kyslíku; ETSC = kapacita elektrontransportního systému; ROX = reziduální spotřeba kyslíku; L = stav LEAK; P = aktivní fosforylační respirace s palmitoylkarnitinem (stav P_{FAO}), substráty poskytujícími elektrony komplexu I (P_{FAO+I}), sukcinátem ($P_{FAO+I+II}$); $E_{FAO+I+II}$ = elektrontransportní kapacita po titraci rozpřahovače FCCP; E_{II} = elektrontransportní kapacita komplexu II po přidání inhibitoru komplexu I (rotenonu); CIV = rozpřažená kapacita komplexu IV. U = uzavření komůrky; Dig = digitonin použitý na permeabilizaci buněčné membrány; MPcar = malát + palmitoylkarnitin; D = ADP; Cyt = cytochrom c; G = glutamát; Pyr = pyruvát; O = otevření komůrky oxygrafu; S = sukcinát; Omy = oligomycin; FCCP = karbonylkyanid-p-trifluorometoxy-fenylhydrazon; Rot = rotenon; AmA = antimycin A; TMPD = tetrametyl- p-fenylendiamin; As = askorbát; Azd = azid sodný. Přesné koncentrace substrátů, inhibitorů a rozpřahovače jsou uvedené v metodické části práce, stejně jako definice jednotlivých respiračních stavů. Převzato a upraveno dle Jedlička et al., 2021.

Metabolická analýza Seahorse

Metabolický analyzátor Seahorse měří spotřebu kyslíku v intaktních buňkách (OCR – oxygen consumption rate) a současně zvyšování acidity média (ECAR – extracellular acidification rate) na speciálních mikrotitračních destičkách s daným počtem jamek podle typu přístroje. Naše pracoviště je vybaveno analyzátorem XFp (Seahorse bioanalyzer XFp; Agilent, Santa Clara, CA, USA), který pracuje s 8jamkovými destičkami a umožňuje tak současné měření dvou vzorků buněk (obrázek 8). Měření probíhá na optickém principu, kdy LED diody vyzařují světlo, jež pohlcují atomy kyslíku v závislosti na jeho koncentraci v médiu, která je tak nepřímo úměrná změřené intenzitě luminiscenčního záření. Během měření vznikají v jamkách destiček mikrokomůrky o objemu menším než 3 µl, do nichž lze během analýzy přidat až 4 látky ovlivňující spotřebu kyslíku nebo produkci protonů. V našich experimentech jsme se zaměřili na stanovení základní klidové respirace destičkami (basal OCR), která odpovídá stavu ROUTINE ve vysoce účinné respirometrii a produkce ATP, jež se vypočítává na základě změn OCR a ECAR po aplikaci inhibitoru ATP-syntázy oligomycinu a inhibitoru komplexu III antimycinu A. Použili jsme komerční kity Agilent Seahorse XF Real-Time ATP Rate Assay Kit (Agilent, Santa Clara, CA, USA). Vlastní produkce ATP mitochondriální a glykolytickou cestou byla zjištěna pomocí Seahorse XF Real-Time ATP rate Assay Report (Agilent, Santa Clara, CA, USA).



Obrázek 8 – Metabolický analyzátor Seahorse XFp (A) a záznam experimentu na trombocytech (B)

2.3.3 Metody vztahující se k cíli 4

Pokusná zvířata

Ve studii jsme použili transgenní potkany s geneticky indukovaným modelem Alzheimerovy choroby TgF-344 AD z chovného zařízení na LF UK v Plzni. Exprese transgenů byla u každého zvířete ověřena jejich přítomností ve vzorku z ocasu pomocí PCR. Zdraví potkani kmene F-344 odpovídajícího věku ze stejného chovného zařízení byli použiti jako kontroly. Zvířata byla v chovných klecích umístěna po dvou při stálé teplotě (23 ± 2 °C) a světelném režimu 12 hodin světlo/12 hodin tma. Pokusy byly schváleny Odbornou komisí pro zajišťování dobrých životních podmínek pokusných zvířat Lékařské fakulty v Plzni, Univerzity Karlovy a Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy České republiky (č. MŠMT 19751/2020-2) v souladu s Evropskou směrnicí na ochranu obratlovců používaných pro pokusné a jiné vědecké účely (86/609/EHS).

Chemikálie, roztoky, média

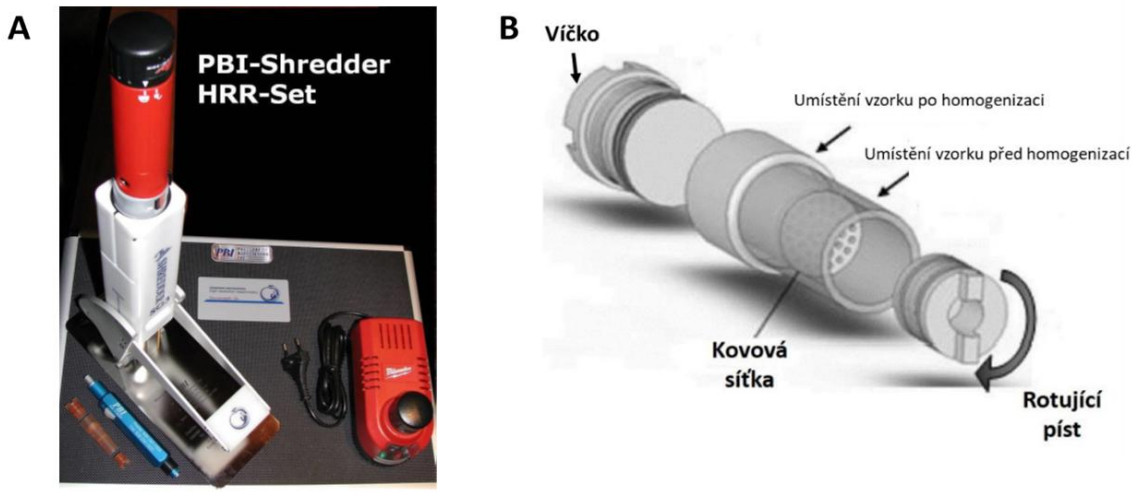
Pokud není uvedeno jinak, všechny použité chemikálie byly zakoupeny v analytické čistotě od společnosti Merck (Sigma-Aldrich; Praha, Česká republika):

A. Uretan na anestezii: Roztok uretanu byl připraven ve sterilní apyrogenní vodě v koncentraci 500 $mg \cdot ml^{-1}$.
B. Roztok určený pro ochranu funkce mitochondrií BIOPS (relaxační a bioptický konzervační roztok) obsahoval: 2,77 $mmol \cdot l^{-1}$ bezvodého CaK_2EGTA; 7,23 $mmol \cdot l^{-1}$ bezvodého K_2EGTA; 20 $mmol \cdot l^{-1}$ imidazolu; 20 $mmol \cdot l^{-1}$ taurinu; 50 $mmol \cdot l^{-1}$ 2-(N-morfolino)-ethansulfonátu draselného; 0,5 $mmol \cdot l^{-1}$ dithiothreitolu; 6,56 $mmol \cdot l^{-1}$ $MgCl_2 \cdot 6H_2O$; 5,77 $mmol \cdot l^{-1}$ Na_2ATP; 15 $mmol \cdot l^{-1}$ Na_2fosfokreatinu; pH 7,1 [Pesta a Gnaiger, 2012].
C. Roztoky určené pro měření mitochondriálních funkcí vysoce účinnou respirometrií:
    a. Respirační médium pro vysoce účinnou respirometrii MIR05: 0,5 $mmol \cdot l^{-1}$ EGTA; 3 $mmol \cdot l^{-1}$ $MgCl_2 \cdot 6H_2O$; 60 $mmol \cdot l^{-1}$ laktobionátu draselného; 20 $mmol \cdot l^{-1}$ taurinu; 10 $mmol \cdot l^{-1}$ KH_2PO_4; 20 $mmol \cdot l^{-1}$ HEPES; 110 $mmol \cdot l^{-1}$ sacharózy; 1 $g \cdot l^{-1}$ hovězího albuminu bez mastných kyselin; pH 7,0 [Pesta a Gnaiger, 2012].
    b. Respirační médium pro intaktní trombocyty PBSG obsahovalo: 7,5 $mmol \cdot l^{-1}$ $Na_2HPO_4 \cdot 7H_20$; 2,5 $mmol \cdot l^{-1}$ $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$; 137 $mmol \cdot l^{-1}$ NaCl; 2,7 $mmol \cdot l^{-1}$ KCl a 10 $mmol \cdot l^{-1}$ glukózy.

D. Prokainový roztok na počítání trombocytů obsahoval 86 $mmol \cdot l^{-1}$ hydrochloridu prokainu a 34 $mmol \cdot l^{-1}$ NaCl v destilované vodě.
E. Protisrážlivý roztok K_2EDTA byl připraven do 10mililitrové stříkačky v objemu 0,2 ml (při přímém odběru krve ze srdce anestezovaného potkana) nebo se 0,1 ml tohoto roztoku dalo do 25 ml kádinky, do níž byla krev po dekapitaci potkana vypuštěna. Obsahoval 50 mg K_2EDTA v 1 ml vody.

Příprava tkání a trombocytů potkana

Po anestezii uretanem (1 $g \cdot kg^{-1}$ tělesné hmotnosti) byla pokusná zvířata dekapitována, volně vytékající krev byla zachycena do kádinky se 100 µl protisrážlivého roztoku K_2EDTA a jemně promíchána. Hipokampus, mozeček, srdeční komory, ledvina, játra a kosterní sval (musculus soleus) byly urychleně vyjmuty do ledově chladného roztoku BIOPS. Kromě vzorku z pravého laloku jater, který byl jemně mechanicky permeabilizován pomocí dvou ostrých pinzet, byly všechny vzorky homogenizovány (a tím permeabilizovány) v roztoku MIR05 pomocí PBI-Shredder SG3 O2k-Setu (Oroboros Instruments; Innsbruck Austria), což je homogenizátor tkání, který umožňuje standardizované rozmělnění tkáně usnadňující reprodukovatelnost výsledků (obrázek 9). Ze srdce byly odebrány kousky tkáně z proximální přední stěny pravé a levé srdeční komory, z ledviny vzorek kůry a z mozečku kůra. Takto zpracované vzorky byly použity pro analýzu pomocí respirometrie s vysokým rozlišením (viz dále). Všechny vzorky byly aplikovány do komůrek oxygrafu v dubletech.



Obrázek 9 – PBI-Shredder SG3 (A) a homogenizační zkumavka s kovovou síťkou (B)
Převzato a upraveno dle Draxl et al., 2015 a Gross et al., 2011.

Trombocyty byly izolovány identickým postupem jako u lidí v části Metody vztahující se k cílům 2 a 3. Po přelití krve do 50ml zkumavek, promíchání s prostaglandinem E1 a opakované centrifugaci byly destičky aplikovány do komůrek oxygrafu. Vzhledem k velkému počtu zpracovávaných tkání byl využit jen respirační protokol pro intaktní trombocyty, který více odpovídá fyziologickému stavu in vivo. Jako respirační médium jsme použili roztok PBSG smíchaný s vlastní plazmou potkana v poměru 1:1.

Použité titrační protokoly [Gnaiger, 2014; Pesta a Gnaiger, 2012]

Intaktní trombocyty

Po ekvilibraci koncentrace kyslíku v médiu v komůrce oxygrafu a atmosférickém vzduchu a následné kalibraci přístroje byly do komůrek přidány trombocyty a odebrán 25µl vzorek na stanovení počtu destiček v Bürkerově komůrce. Po ustálení spotřeby kyslíku byly stanoveny následující respirační stavy: Bazální endogenní spotřeba kyslíku (stav ROUT). Po aplikaci oligomycinu (2 $\mu g \cdot ml^{-1}$) byl navozen stav LEAK. Titrace protonoforu FCCP (kroky po 0,5 $\mu mol \cdot l^{-1}$) umožnila stanovení ETSC, tj. maximální kapacity elektrontransportního systému po kolapsu fosforylace. Všechny stavy byly následně korigovány na reziduální spotřebu kyslíku indukovanou přidáním rotenonu (0,5 $\mu mol \cdot l^{-1}$) a antimycinu A (2,5 $\mu g \cdot ml^{-1}$).

Homogenizované nebo permeabilizované tkáně potkana

Pro homogenizované vzorky srdečních komor, kosterního svalu, kůry ledvin a permeabilizované vzorky jaterní tkáně byl použit totožný titrační protokol, při kterém se do komůrek se vzorky postupně aplikovaly roztoky substrátů a inhibitorů elektrontransportního systému. Pro zjištění maximální kapacity elektrontransportního systému byl do komůrek titrován protonofor (FCCP). Přehled aplikovaných látek, jejich obvyklých zkratek, konečných koncentrací v komůrkách oxygrafu, jejich základní charakteristiky a jimi navozených respiračních stavů podává tabulka 3.

Pro vzorky hipokampu a mozečku byl využit podobný protokol, ale s vynecháním mastné kyseliny: M – G (LEAK-I) – D – c – P (OXPHOS-I) – S (OXPHOS-I+II) – FCCP (ETSC-I+II) – Rot (ETSC-II) – Ama (ROX) – As/TMPD – Azd (CIV).

Stejně jako u intaktních trombocytů byly všechny stavy korigovány na ROX.

Tabulka 3 – Přehled látek aplikovaných do komůrek oxygrafu při analýze mitochondriální respirace srdečních komor, kosterního svalu, kůry ledvin a jater

	Titrovaná látka	Zkr.	Konečná koncentrace	Funkce	Navozený stav
1	Malát + Palmitoylkarnitin	MPcar	0,04 mmol/l 0,1 mmol/l	Substráty nutné pro zahájení oxidace MK	LEAK-FAO
2	ADP	D	5 mmol/l	Substrát ATP-syntázy	
3	Cytochrom c	c	10 μmol/l	Kontrola propustnosti OMM	OXPHOS-FAO
4	Glutamát	G	10 mmol/l	Substrát KI	
5	Pyruvát	Pyr	5 mmol/l	Substrát KI	OXPHOS-FAO +I
6	Sukcinát	S	50 mmol/l	Substrát KII	OXPHOS-FAO +I+II
7	FCCP	FCCP	kroky po 0,5 μmol/l	Protonofor	ETSC-FAO+I+ II
8	Rotenon	Rot	0,5 μmol/l	Inhibitor KI	ETSC-II
9	Antimycin A	AmA	2,5 μg/ml	Inhibitor KIII	ROX
10	TMPD + Askorbát	TMPD + As	0,5 mmol/l 2 mmol/l	Substrát KIV a redukční činidlo	
11	Azid	Azd	100 mmol/l	Inhibitor KIV	CIV

Zkr. = zkratka; MK = mastné kyseliny; ADP = adenosindifosfát; ATP = adenosintrifosfát; KI–KIV = respirační komplexy I–IV; FCCP = karbonyl-kyanid-p-trifluorometoxy-fenylhydrazon; TMPD = tetrametyl-p-fenylendiamin.

2.3.4 Zpracování dat a statistika

V jednotlivých cílech práce byly vypočteny základní statistické charakteristiky, včetně aritmetického průměru, směrodatné odchylky nebo extrémních hodnot (minimum, maximum). U kategorických proměnných byla provedena analýza četností, zahrnující absolutní i relativní zastoupení jednotlivých kategorií.

Výsledky v grafech a tabulkách jsou prezentovány jako průměr ± směrodatná odchylka průměru (SD). Normalita rozložení byla v jednotlivých souborech dat testována pomocí Shapirova-Wilkova testu. V případě potřeby byla provedena logaritmická transformace dat. Při porovnání průměrů více skupin byla použita dvoufaktorová ANOVA (tkáně a buňky potkana; faktory pohlaví a experimentální skupina) s následným Tukeyovým post-hoc testem. V případě porovnání dvou skupin byl využit Studentův nepárový t-test, Welchův test, případně

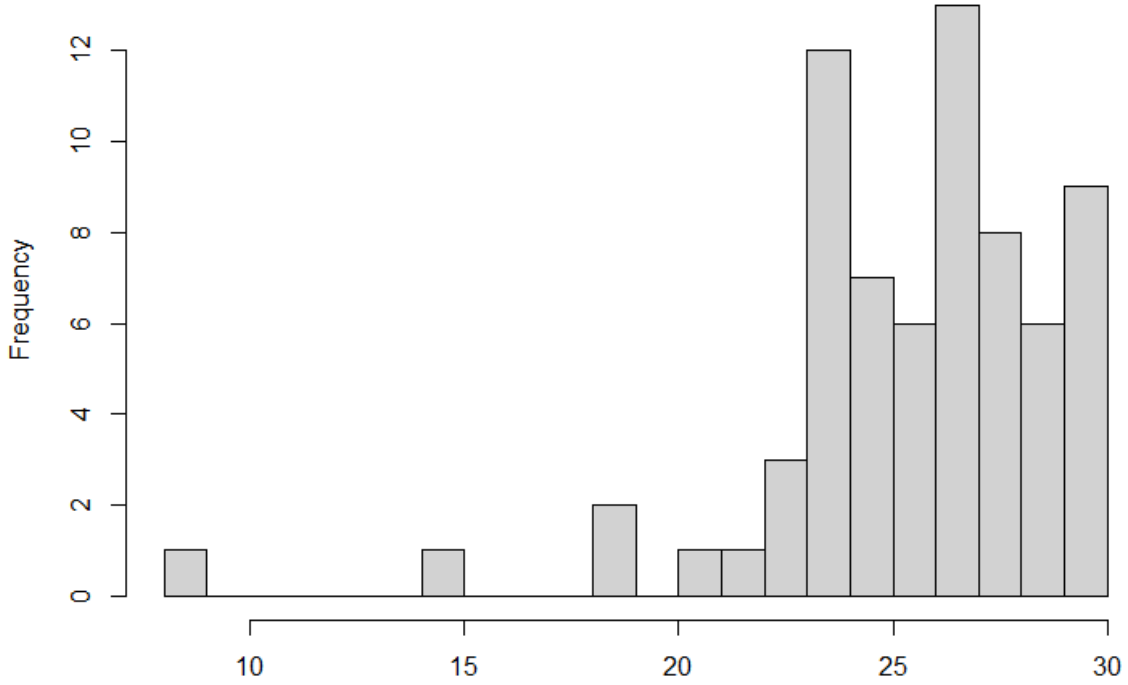
Mann-Whitneyův U test tam, kde se nepodařilo získat normální rozložení dat ani po jejich logaritmické transformaci. Pro odhad asociace mezi věkem, výsledky SPPB a MoCA testu byl použit výpočet Kendallova tau, pro vizualizaci dat byla využita metoda loess. Pro data získaná z tkání potkana byly vypočteny Spearmanovy korelační koeficienty. Statistické analýzy byly provedeny pomocí SW Origin 2019 (OriginLab, Corp., Northampton, MA, USA). Hodnoty $p < 0,05$ byly považovány za statisticky významné.

Spotřeba kyslíku v jednotlivých respiračních stavech byla vždy korigována na ROX (reziduální spotřebu kyslíku) a vyjádřena v $pmol \cdot s^{-1} \cdot mg^{-1}$ vlhké hmotnosti tkáně nebo v $pmol \cdot s^{-1} \cdot 10^{-8}$ buněk.

2.4 Výsledky

2.4.1 Výsledky vztahující se k cíli 1

Průměrný věk souboru 70 zdatných a nezávislých seniorů byl 76,2 ± 5 let (min. 70, max. 95). Jejich průměrné skórování v MoCA testu bylo 25,9 ± 3,6 bodů (min. 8, max. 30). Mezi kognitivně zdravé se na základě testování zařadilo 42 dobrovolníků (tj. 60 %), u dalších 28 (tj. 40 %) byly naměřené hodnoty suspektní z kognitivní poruchy. Souhrnná fyzická zdatnost souboru byla vysoká, průměrné skóre SPPB testu dosáhlo 10,7 ± 2,5 bodů. Jednostranný test Kendallova koeficientu prokázal negativní korelaci věku se skóry SPPB (τ = -0,21; $p < 0,05$) a MOCA (τ = -0,21; $p < 0,01$).

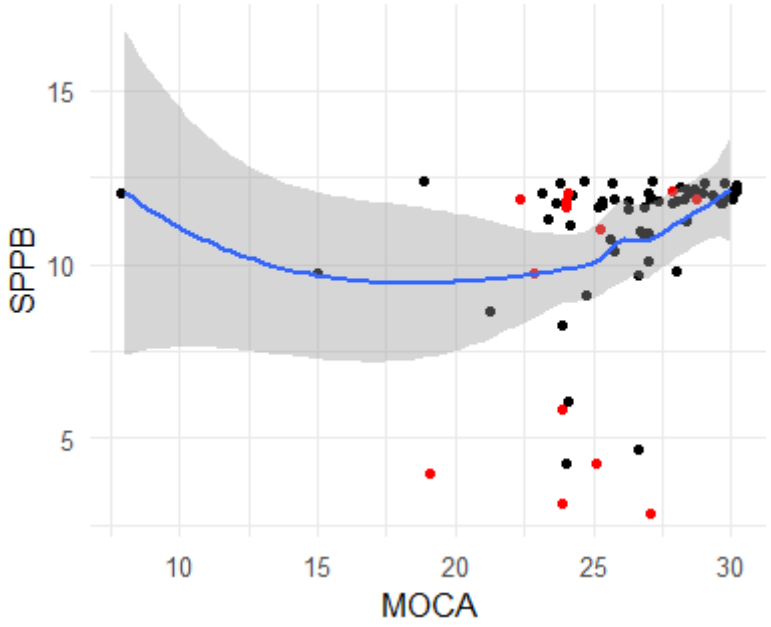


Obrázek 9 – Histogram MoCA skórů ve zkoumaném souboru dobrovolníků

Seniorů ve věku 70–79 let bylo hodnoceno 53. Jejich průměrný věk byl 74 ± 2,7 let a průměrný výsledek MoCA testu byl 26,2 ± 3,9 bodů. U 16 z nich byly naměřeny hodnoty suspektní z kognitivní poruchy (tj. 30,2 %). Fyzická zdatnost dle SPPB zde dosáhla průměrné hodnoty 11,1 ± 1,8 bodů.

Seniorů ve věku 80 a více let bylo hodnoceno 17. Jejich průměrný věk byl 83,3 ± 3,9 let a průměrný výsledek MoCA testu byl 24,7 ± 2,4 bodů. U 12 dobrovolníků v této nejstarší testované skupině byl výsledek suspektní z kognitivní poruchy (tj. 70,6 %). Fyzická zdatnost dle SPPB zde dosáhla průměrné hodnoty 9,4 ± 3,7 bodů.

Test MMSE podstoupilo 56 dobrovolníků, jejichž průměrný věk činil 75,9 ± 5 let a průměrné skóre v MMSE dosáhlo 28,3 ± 2,6 bodů. U 12 dobrovolníků byly naměřeny hodnoty suspektní z kognitivní dysfunkce (21,4 %), z nichž pouze 3 skórovali ≤ 25 bodů.



Obrázek 10 – Korelace SPPB a MoCA
Černé tečky označují dobrovolníky ≤ 79 let a červené dobrovolníky ≥ 80 let. Vztah SPPB a MoCA skórů je odhadnutý metodou loess (modrá čára s šedým vyznačením odhadované přesnosti).

Nižší kognitivní výkon dle MoCA testu byl asociován s nižší fyzickou zdatností seniorů měřenou pomocí SPPB (obrázek 10). Korelace mezi skóry SPPB a MoCA byla pro zamezení zkreslení outliery ověřována jednostranným testem Kendallova koeficientu, který potvrdil očekávaný pozitivní vztah ($\tau = 0{,}31$; $p < 0{,}001$). Tento vztah byl signifikantní i při použití MMSE ($\tau = 0{,}21$; $p < 0{,}05$). Orientační hodnocení aktivity dobrovolníků členy výzkumného týmu neprokázalo podobný vztah, respektive u pacientů s nižším stupněm aktivity než „aktivní“ nebyl výkon v MoCA statisticky signifikantně snížený oproti těm, kteří byli hodnoceni jako „aktivní“ (jednostranný Welchův t-test: $t(36{,}53) = 1{,}01$; $p = 0{,}16$).

Jako kontrolní skupina pro další cíle byla vybrána skupina seniorů (ST1) s výsledkem MoCA testu ≥ 26 bodů (N = 42). Průměrná hodnota SPPB zde dosáhla 11,3 ± 1,8 bodů. Dobrovolníkům s výsledkem testu 24 – 25 bodů bylo doporučeno opakování testu s odstupem nebo dovyšetření u neurologa, psychiatra či geriatra. Dobrovolníkům se skórem ≤ 23 bodům bylo doporučeno dovyšetření u neurologa, psychiatra či geriatra a v případě zájmu byli objednáni na geriatrickou ambulanci ve FN Plzeň.

2.4.2 Výsledky vztahující se k cíli 2

Hodnocení vlivu stárnutí na mitochondriální respiraci trombocytů bylo hodnoceno na základě srovnání již charakterizovaných souborů, mladých zdravých jedinců (ML) a vysoce selektované skupiny seniorů reprezentující normální stárnutí (ST1A).

Mitochondriální respirace intaktních trombocytů

Jak ukazuje tabulka 4, spotřeba kyslíku ve stavech ROUT a ETSC stanovená pomocí respirometrie s vysokým rozlišením (Oxygraf O2k) byla významně nižší u krevních destiček skupiny ST1A. Mitochondriální rezervní respirační kapacita vypočtená odečtením respirace ROUT od stavu ETSC (E-R) byla také významně nižší u destiček ST1A, stejně jako spotřeba kyslíku související s oxidativní produkcí ATP, tj. rozdíl mezi stavy ROUT a LEAK (R-L). Stav odpovídající ROUT respiraci stanovený metabolickým analyzátorem Seahorse (bazální OCR) byl také významně vyšší u skupiny ML ve srovnání s trombocyty ve skupině ST1A. Kromě toho stanovení rychlosti produkce ATP pomocí metabolického analyzátoru Seahorse jasně ukázalo, že u skupiny ST1A byla mitochondriální a celková produkce ATP snížena ve srovnání se skupinou ML, ale glykolytická produkce ATP se mezi těmito dvěma skupinami významně nelišila (tabulka 4). Rychlost extracelulární acidifikace (ECAR) zhruba odrážející glykolýzu se mezi oběma skupinami nelišila, avšak její zvýšení po injekci oligomycinu (tj. po inhibici ATP-syntázy) bylo významně nižší u destiček ST1A (obrázek 11).

Mitochondriální respirace permeabilizovaných trombocytů

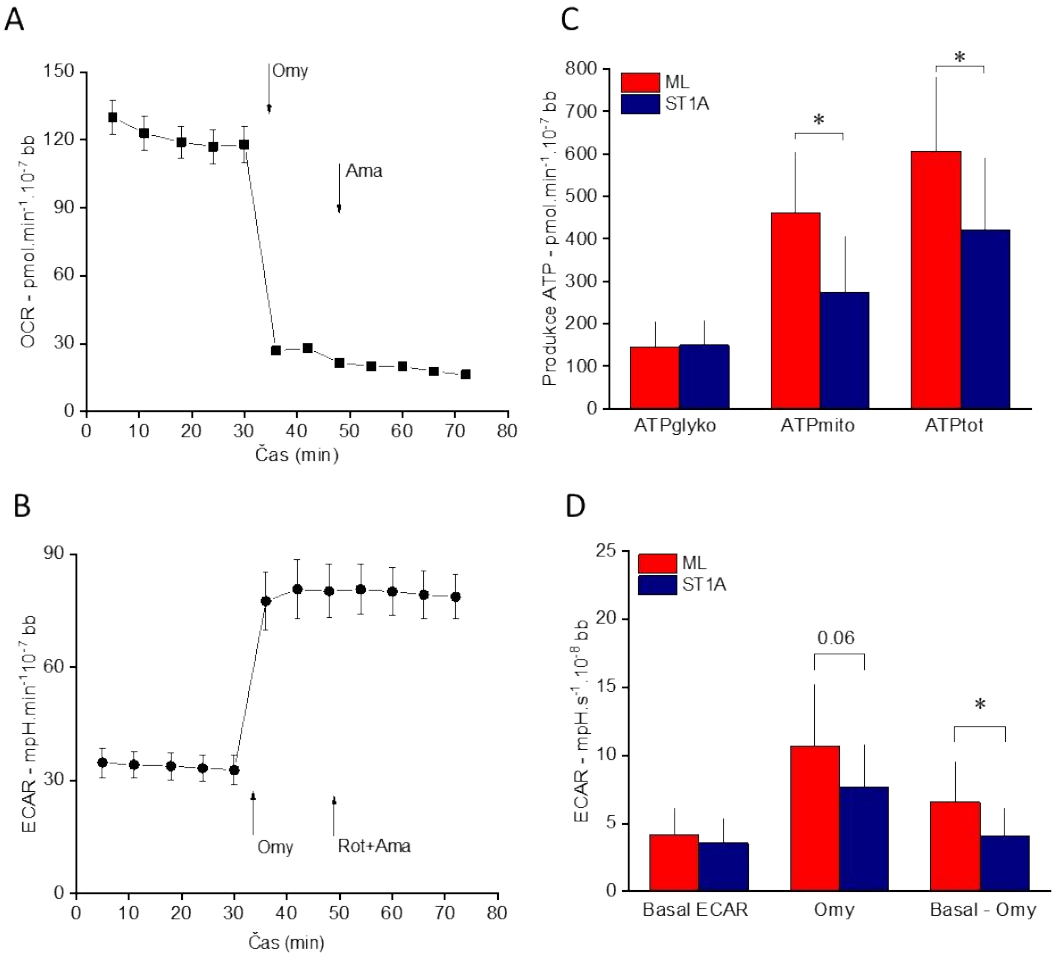
Také v permeabilizovaných trombocytech byla mitochondriální respirace vyšší ve skupině ML (tabulka 5). Statisticky významných rozdílů bylo dosaženo ve stavech LEAK po malátu a palmitoylkarnitinu (LEAK-FAO), OXPHOS po aplikaci sukcinátu (OXPHOS-FAO+I+II), ETSC po FCCP (ETSC-FAO+I+II) a rotenonu (ETSC-II); nejvýznamnější rozdíl byl zaznamenán ve stavu CIV.

V krevních destičkách odebraných od starších dospělých (ST1A) se fosforylační kapacity snížily o 22 – 31 %, rozpřažené stavy o 26 % a kapacita komplexu IV dokonce o 45 %.

Tabulka 4 – Bioenergetické parametry intaktních trombocytů stanovené respirometrií s vysokým rozlišením (O2k) a metabolickým analyzátorem Seahorse u skupin ML a ST1A

O2k			
	ML	**ST1A**	**p**
ROUT	10,2 ± 3,0	7,1 ± 2,8	< 0,005
LEAK	1,5 ± 0,6	1,2 ± 0,5	n.s.
ETSC	14,3 ± 5,7	7,6 ± 3,5	< 0,005
ROX	0,8 ± 0,4	0,7 ± 0,5	n.s.
R-L	8,7 ± 3,7	5,9 ± 2,5	< 0,001
E-R	4,4 ± 4,2	0,6 ± 3,1	< 0,01
R/L	7,4 ± 1,8	6,1 ± 1,9	n.s.
L/E	0,1 ± 0,1	0,2 ± 0,1	< 0,05
SEAHORSE			
OCR basal	14,5 ± 7,9	8,9 ± 4,0	< 0,05
OCR leak	2,0 ± 2,5	1,3 ± 0,7	n.s.
OCR rox	3,5 ± 2,0	2,2 ± 0,8	n.s.
B-L	11,9 ± 6,4	7,6 ± 3,8	= 0,06
B/L	16,3 ± 15,3	8,4 ± 4,8	n.s.
ATPglyko	146 ± 59	149 ± 59	n.s
ATPmito	460 ±143	274 ± 135	< 0,01
ATPtot	606 ±173	422 ±169	< 0,05
% glyko	24 ± 7	37 ± 13	< 0,05

Respirační stavy jsou vyjádřeny v pmol $O_2 \cdot s^{\cdot -1} \cdot 10^{-8}$ trombocytů, rychlost produkce ATP v $pmol \cdot min^{-1} \cdot 10^{-7}$ buněk, respirační kontrolní poměry v relativních jednotkách. ROUT = základní respirace; ETSC = kapacita elektrontransportního systému; ROX = reziduální spotřeba kyslíku; R-L = spotřeba kyslíku odpovídající oxidativní produkci ATP, čistá základní respirace; R/L = ROUT/LEAK, relativní ukazatel bazální fyziologické respirace vztažené k produkci ATP; L/E = LEAK/ETSC, poměr kontroly spřažení; E-R = rozdíl stavů ETSC a ROUT, rezervní kapacita; OCR – spotřeba kyslíku (z oxygen consumption rate); B-L = rozdíl bazální a leak respirace vztahující se k oxidativní produkci ATP; ATPglyko = rychlost glykolytické produkce ATP; ATPmito = rychlost mitochondriální oxidativní produkce ATP; ATPtot = celková produkce ATP; % glyko = poměr glykolytické k celkové produkci ATP v %. Přesné definice respiračních stavů a použité titrační protokoly jsou popsány v kapitole Metody. n.s. = nesignifikantní rozdíl.



Obrázek 11 – Stanovení rychlosti syntézy ATP (ATP rate assay)

A) OCR (spotřeba O_2, z anglického oxygen consumption rate) v jednom experimentu. Omy = oligomycin; Ama = antimycin A; Rot = rotenon.

B) ECAR (rychlost extracelulární acidifikace, z anglického extracellular acidification rate) ve stejném experimentu.

C) Rychlost produkce ATP v destičkách odebraných od mladších (ML) a starších dospělých (ST1A). ATPglyko = glykolytická produkce ATP, ATPmito = mitochondriální produkce ATP, ATPtot = celková produkce ATP.

D) ECAR v destičkách odebraných od mladších (ML) a starších dospělých (ST1A). Omy = ECAR po aplikaci oligomycinu; Basal-Omy = rozdíl mezi bazální ECAR a po aplikaci oligomycinu.

Všechny bioenergetické parametry byly normalizovány na 10^7 nebo 10^8 buněk.

Symbol * označuje $p < 0,05$.

Převzato a upraveno dle Jedlička et al., 2021.

Tabulka 5 – respirační parametry permeabilizovaných trombocytů mladších (ML) a starších (ST1A) zdravých osob stanovené respirometrií s vysokým rozlišením (O2k)

STAV	Protokol	ML	ST1A	p	ST1A/ML %
ROUT		7,0 ± 2,4	6,3 ± 2,0	n.s.	90
	+dig	2,9 ± 1,3	1,6 ± 0,9		
LEAK-FAO	+M +Pcar	5,0 ± 1,6	3,1 ± 1,6	< 0,05	62
OXPHOS-FAO	+D	9,4 ± 5,2	6,5 ± 3,9	n.s.	69
OXPHOS-FAOc	+c	9,2 ± 5,5	7,2 ± 4,3	n.s.	78
OXPHOS-FAO+I	+G	13,1 ± 8,3	10,3 ± 6,1	n.s.	79
OXPHOS-FAO+IP	+P	12,8 ± 8,0	9,8 ± 5,9	n.s.	77
OXPHOS-FAO+I+II	+S	24,8 ± 10,5	18,5 ± 8,2	< 0,05	75
LEAK-OMY	+Omy	5,6 ± 1,6	5,0 ± 1,2	n.s.	89
ETSC-FAO+I+II	+FCCP	27,4 ± 13,2	20,3 ± 10,3	< 0,05	74
ETSC-II	+Rot	13,8 ± 6,6	10,2 ± 4,7	< 0,05	74
CIV	+TMPD/As + Azd	76,5 ± 23,5	42,0 ± 15,6	< 0,001	55

Respirační stavy jsou vyjádřené v pmol $O_2 \cdot s^{-1} \cdot 10^{-8}$ trombocytů. ROUT = klidová respirace; LEAK-FAO = stav LEAK po přidání palmitoyl-L-karnitinu; OXPHOS = aktivní fosforylační respirační stav s palmitoyl-L-karnitinem (OXPHOS-FAO), substráty poskytujícími elektrony komplexu I malátem a glutamátem (OXPHOS-I), pyruvátem (OXPHOS-IP) a sukcinátem (I+II); LEAK-OMY = stav LEAK po přidání oligomycinu; ETSC-II = kapacita elektrontransportního systému po inhibici komplexu I rotenonem; CIV = rozpřažená respirační kapacita komplexu IV; dig = digitonin; M = malát; Pcar = palmitoyl-L-karnitin; D = ADP; c = cytochrom c; G = glutamát; Pyr = pyruvát; S = sukcinát; FCCP = karbonylkyanid-p-trifluorometoxy-fenylhydrazon; rot = rotenon; TMPD = tetrametyl-p-fenylendiamin; As = askorbát; Azd = azid. Přesné definice respiračních stavů a použité titrační protokoly jsou popsány v kapitole Metody. n.s. = nesignifikantní rozdíl.

2.4.3 Výsledky vztahující se k cíli 3

Mitochondriální respirace intaktních trombocytů pacientů se syndromem demence

Při srovnání skupin DEM a ST1 byla aktivita komplexu IV (CIV) podle očekávání statisticky významně snížená v trombocytech u pacientů trpících demencí. Překvapivým nálezem byla signifikantně vyšší respirace trombocytů dementních pacientů ve stavu ETSC a naopak nižší ve stavu LEAK, což se odrazilo i ve vypočtených indikátorech rozpřažení oxidace a fosforylace (L/R a L/E; tabulka 6).

Tabulka 6 – Respirační parametry intaktních trombocytů stanovené respirometrií s vysokým rozlišením (O2k) u souborů ST1 a DEM

	ST1	DEM	p
ROUT	8,2 ± 2,4	8,5 ± 2,1	n.s.
LEAK	1,5 ± 0,6	1,2 ± 0,3	0,011
ETSC	7,6 ± 3,8	10,3 ± 4,4	0,0017
ROX	0,9 ± 0,2	1,0 ± 0,9	n.s.
CIV	35,5 ± 4,9	31,9 ± 2,7	0,016
R-L	6,7 ± 2,1	7,3 ± 2,0	n.s.
E-R	0,6 ± 3,1	1,8 ± 3,4	0,0005
L/R	0,19 ± 0,05	0,15 ± 0,05	0,002
L/E	0,24 ± 0,13	0,15 ± 0,08	0,0001

Respirační stavy jsou vyjádřeny v pmol $O_2 \cdot s^{-1} \cdot 10^{-8}$ trombocytů; hodnoty jsou zapsány jako průměr ± SD. ROUT = základní respirace; LEAK = spotřeba O_2 nutná pro udržení mitochondriálního membránového potenciálu; ETSC = kapacita elektrontransportního systému; ROX = reziduální spotřeba kyslíku; CIV = aktivita komplexu IV, R-L = spotřeba kyslíku odpovídající oxidativní produkci ATP, čistá základní respirace; E-R = rozdíl stavů ETSC a ROUT, rezervní kapacita; L/R = LEAK/ROUT; L/E = LEAK/ETSC, poměry kontroly spřažení.

Statistické srovnání uvádíme také u mitochondriální respirace krevních destiček kognitivně intaktní skupiny bez významné osobní a lékové anamnézy (ST1A) a dementních pacientů (tabulka 7). Jediný statisticky významný rozdíl byl identifikován v parametru CIV, který byl u vzorků odebraných od pacientů trpících demencí nižší.

Tabulka 7 – Respirační parametry intaktních trombocytů stanovené respirometrií s vysokým rozlišením (O2k) u souborů ST1A a DEM

	ST1A	DEM	p
ROUT	7,56 ± 2,72	8,51 ± 2,12	0,14
LEAK	1,27 ± 0,48	1,24 ± 0,32	0,74
ETSC	8,17 ± 3,81	10,3 ± 4,35	0,06
ROX	0,78 ± 0,51	1,04 ± 0,88	0,18
CIV	40,2 ± 2,55	31,9 ± 2,72	<0,001
R-L	6,29 ± 2,48	7,27 ± 2,03	0,1
E-R	0,61 ± 2,84	1,77 ± 3,36	0,16
L/R	0,17 ± 0,05	0,15 ± 0,05	0,1
L/E	0,2 ± 0,11	0,15 ± 0,08	0,06
E/R	1,12 ± 0,45	1,05 ± 0,63	0,64

Respirační stavy jsou vyjádřeny v pmol $O_2 \cdot s^{-1} \cdot 10^{-8}$ trombocytů. ROUT = základní respirace; LEAK = spotřeba O_2 nutná pro udržení mitochondriálního membránového potenciálu; ETSC = kapacita elektrontransportního systému; ROX = reziduální spotřeba kyslíku; CIV = aktivita komplexu IV; R-L = spotřeba kyslíku odpovídající oxidativní produkci ATP, čistá základní respirace; E-R = rozdíl stavů ETSC a ROUT, rezervní kapacita; L/R = LEAK/ROUT; L/E = LEAK/ETSC; E/R = podíl celkové elektrontransportní kapacity a základní respirace.

Mitochondriální respirace permeabilizovaných trombocytů pacientů se syndromem demence

V permeabilizovaných trombocytech dementních pacientů měly všechny respirační stavy OXPHOS a ETSC nižší hodnoty než kontrolní vzorky. Statistické významnosti bylo dosaženo ve stavech OXPHOS-FAO+IP a ETSC-II. Významný byl také rozdíl ve stavu ROUT, ale je třeba poznamenat, že byl stanoven v roztoku odpovídajícím svým složením nikoliv extracelulární, ale intracelulární tekutině a lze ho tedy považovat jen za orientační údaj (tabulka 8).

V tabulce 9 jsou uvedeny signifikantně rozdílné respirační poměry indikující rozpřažení oxidace a fosforylace (L-OMY/ETSC-FAO+I+II), podíl metabolismu mastných kyselin na celkové kapacitě oxidační fosforylace (OXPHOS-FAO/OXPHOS-FAO+I; OXPHOS-FAO+I/OXPHOS-FAO+I+II) a komplexu II na celkové elektrontransportní kapacitě systému (ETSC-II/ETSC-FAO+I+II).

Tabulka 8 – Respirační parametry permeabilizovaných trombocytů stanovené respirometrií s vysokým rozlišením (O2k) u souborů ST1 a DEM

	PROTOKOL	ST1	DEM	DEM/ST1 %
ROUT		6,6 ± 1,7	5,4 ± 2,1*	82
	+dig	1,7 ± 1,0	1,9 ± 1,2	112
LEAK-FAO	+M +Pcar	3,6 ± 1,5	4,2 ± 2,4	117
OXPHOS-FAO	+D	7,2 ± 3,1	6,7 ± 3,7	93
OXPHOS-FAOc	+c	7,7 ± 3,2	6,7 ± 3,7	87
OXPHOS-FAO+I	+G	11,0 ± 4,3	9,2 ± 5,0	84
OXPHOS-FAO+IP	+P	10,6 ± 4,1	8,7 ± 4,9*	82
OXPHOS-FAO+I+II	+S	21,1 ± 6,2	20,8 ± 7,6	99
LEAK-OMY	+Omy	5,5 ± 1,6	6,1 ± 2,2	111
ETSC-FAO+I+II	+FCCP	22,1 ± 7,9	19,0 ± 9,5	86
ETSC-II	+Rot	10,7 ± 5,0	7,5 ± 6,1*	71

Respirační stavy jsou vyjádřené v pmol $O_2 \cdot s^{-1} \cdot 10^{-8}$ trombocytů. ROUT = klidová respirace; LEAK-FAO = stav LEAK po přidání palmitoyl-L-karnitinu; OXPHOS = aktivní fosforylační respirační stav s palmitoyl-L-karnitinem (OXPHOS-FAO), substráty poskytujícími elektrony komplexu I malátem a glutamátem (OXPHOS-FAO+I), pyruvátem (OXPHOS-FAO+IP) a sukcinátem (OXHOS-FAO+I+II); LEAK-OMY = stav LEAK po přidání oligomycinu; ETSC-FAO+I+II = kapacita elektrontransportního systému; ETSC-II = kapacita elektrontransportního systému po inhibici komplexu I rotenonem. Symbol * označuje $p < 0,05$.

Tabulka 9 – Respirační kontrolní poměry permeabilizovaných trombocytů

	ST1	DEM
L-OMY/ETSC-FAO+I+II	0,28 ± 0,12	0,38 ± 0,2*
OXPHOS-FAO/OXPHOS-FAO+I	0,7 ± 0,08	0,79 ± 0,28*
OXPHOS-FAO+I/OXPHOS-FAO+I+II	0,49 ± 0,12	0,41 ± 0,13*
ETSC-II/ETSC-FAO+I+II	0,48 ± 0,16	0,39 ± 0,23*

Respirační poměry indikují rozpřažení oxidace a fosforylace (L-OMY/ETSC-FAO+I+II), podíl metabolismu mastných kyselin na celkové kapacitě oxidační fosforylace (OXPHOS-FAO/OXPHOS-FAO+I; OXPHOS-FAO+I/ OXPHOS-FAO+I+II) a komplexu II na celkové elektrontransportní kapacitě systému (ETSC-II/ETSC-FAO+I+II). Symbol * označuje $p < 0,05$.

Pátrali jsme po souvislostech mezi kognitivní zdatností a mitochondriálními parametry (tabulka 10). Vzhledem k tomu, že pacienti trpící diagnostikovanou demencí většinou nebyli schopni MoCA test absolvovat, korelace jsme vypočítali pro soubor 70 dobrovolníků, kteří se zúčastnili kognitivního screeningu (ST). U přímo měřených parametrů jsme neprokázali vztah s výsledkem MoCA, z vypočtených poměrů pak pro relativní podíl metabolismu mastných kyselin na souhrnné kapacitě oxidační fosforylace při dodávce MK a substrátů přinášejících elektrony ke komplexu I (OXPHOS-FAO/OXPHOS-FAO+I; r = -0,32) a pro tzv. čistý poměr respirace při oxidační fosforylaci a elektrontransportní kapacity (R-L)/E; -0,26).

Tabulka 10 – Korelace mitochondriální respirace s výsledkem testu MoCA

	r
L-OMY/ETSC-FAO+I+II	-0,21*
OXPHOS-FAO/OXPHOS-FAO+I	-0,32*
OXPHOS-FAO+I/OXPHOS-FAO+I+II	-0,057
ETSC-II/ETSC-FAO+I+II	-0,1
(ROUT-LEAK)/ETSC	-0,26*

Pearsonovy korelační koeficienty r mezi výsledkem MoCA testu a vypočtenými mitochondriálními respiračními poměry. L-OMY/ETSC-FAO+I+II = rozpřažení oxidace a fosforylace; OXPHOS-FAO/OXPHOS-FAO+I a OXPHOS-FAO+I/OXPHOS-FAO+I+II = podíl metabolismu mastných kyselin na kapacitě oxidační fosforylace při zapojení komplexu I a na celkové kapacitě oxidační fosforylace; ETSC-II/ETSC-FAO+I+II = podíl elektrontransportní kapacity komplexu II na celkové elektrontransportní kapacitě; (ROUT-LEAK)/ETSC = podíl efektivní respirace na celkové elektrontransportní kapacitě. Symbol * označuje $p < 0,05$.

2.4.4 Výsledky vztahující se k cíli 4

Analyzovali jsme mitochondriální respiraci v 7 tkáních (hipokampu, mozečku, pravé a levé komoře srdeční, kosterním svalu, kůře ledvin a játrech) a trombocytech u 6- a 12měsíčních kontrolních (F344 Fisher) a transgenních potkanů (TgF-344 AD). U 24měsíčních potkanů jsme analyzovali tkáně hipokampu, mozečku, myokardu levé a pravé srdeční komory a jater. Počet zvířat v jednotlivých skupinách ukazuje tabulka 11.

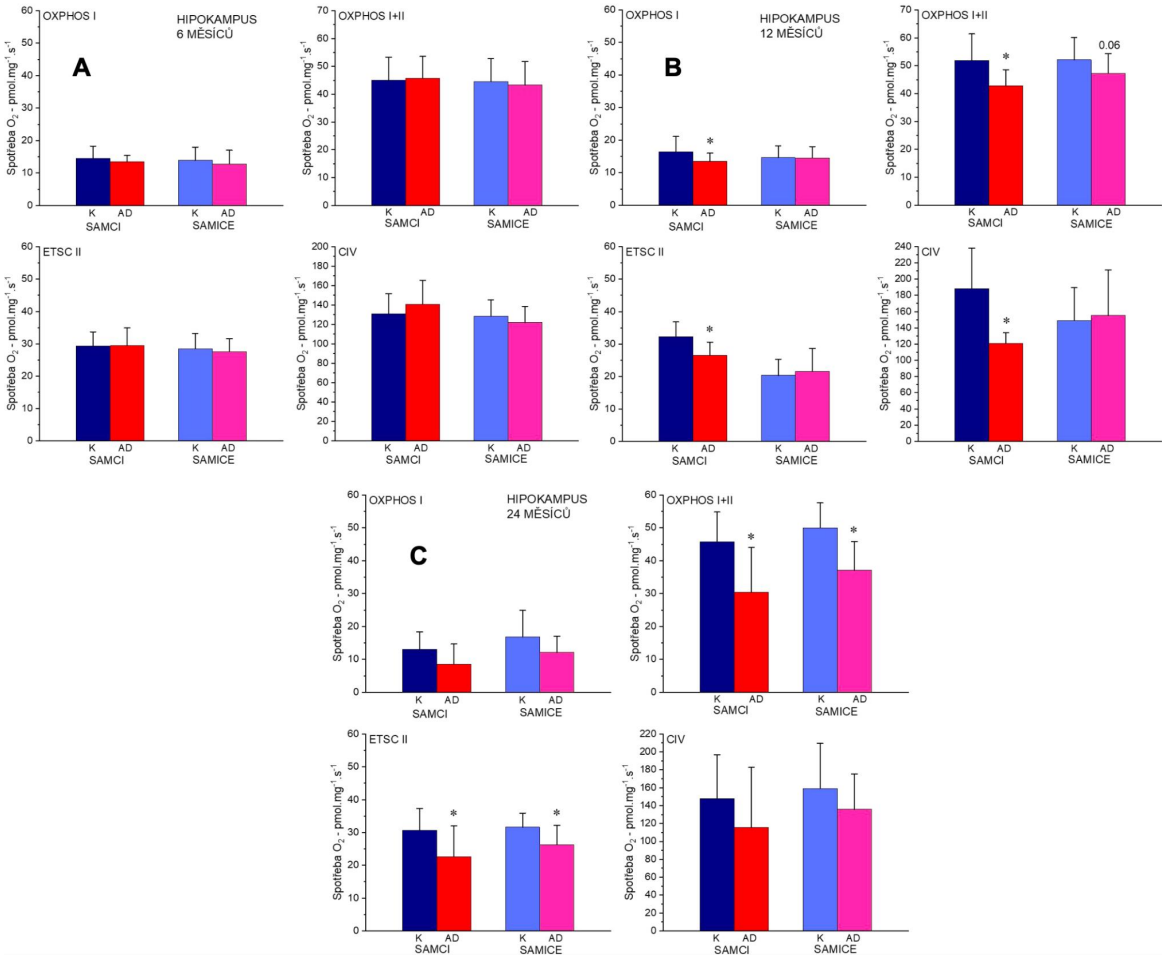
Tabulka 11 – Počet kontrolních (F344 Fisher) a experimentálních (TgF-344 AD) potkanů v jednotlivých skupinách podle věku a pohlaví

VĚK	POHLAVÍ	SKUPINA	N
6 M	SAMCI	KONTROLY	8
		AD	11
	SAMICE	KONTROLY	13
		AD	7
12 M	SAMCI	KONTROLY	13
		AD	10
	SAMICE	KONTROLY	13
		AD	9
24 M	SAMCI	KONTROLY	6
		AD	4
	SAMICE	KONTROLY	7
		AD	7

M = měsíce; AD = potkani ze skupiny TgF-344 AD.

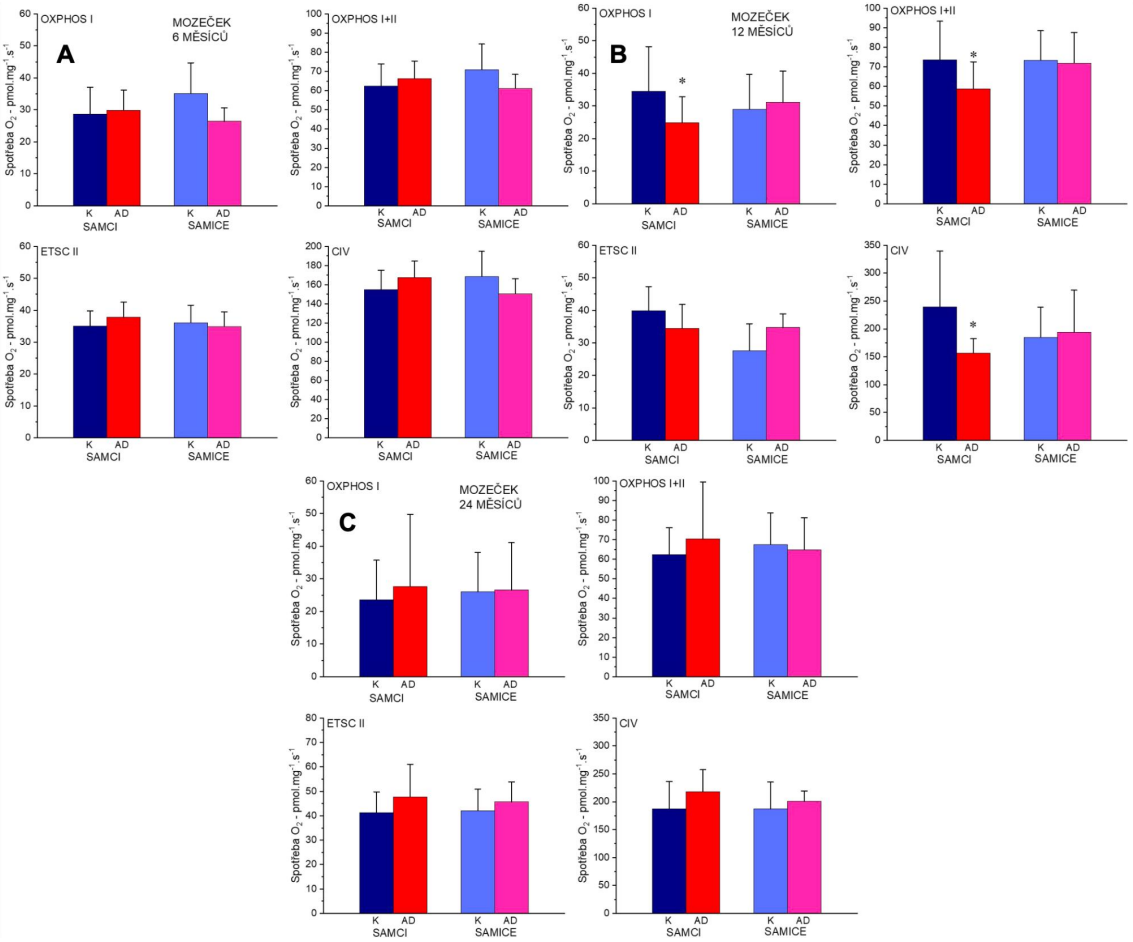
Při analýze mitochondriální spotřeby kyslíku v hipokampu a mozečku pokusných zvířat různých věkových kategoriích jsme z mnoha respiračních parametrů zvolili stavy OXPHOS I, OXPHOS I+II, ETSC II a CIV.

V hipokampu ve věku 6 měsíců jsme nezjistili rozdíl v žádném z uvedených respiračních stavů mezi kontrolními a transgenními potkany. Ve 12 měsících jsme prokázali signifikantně nižší respirační parametry u transgenních samců ve srovnání s kontrolami, zatímco u samic nebyly zaznamenány rozdíly. Ve věku 24 měsíců jsme naměřili signifikantně sníženou mitochondriální spotřebu kyslíku ve stavech OXPHOS-I a ETSC-II u transgenních samců i samic ve srovnání s kontrolní skupinou (obrázek 12).



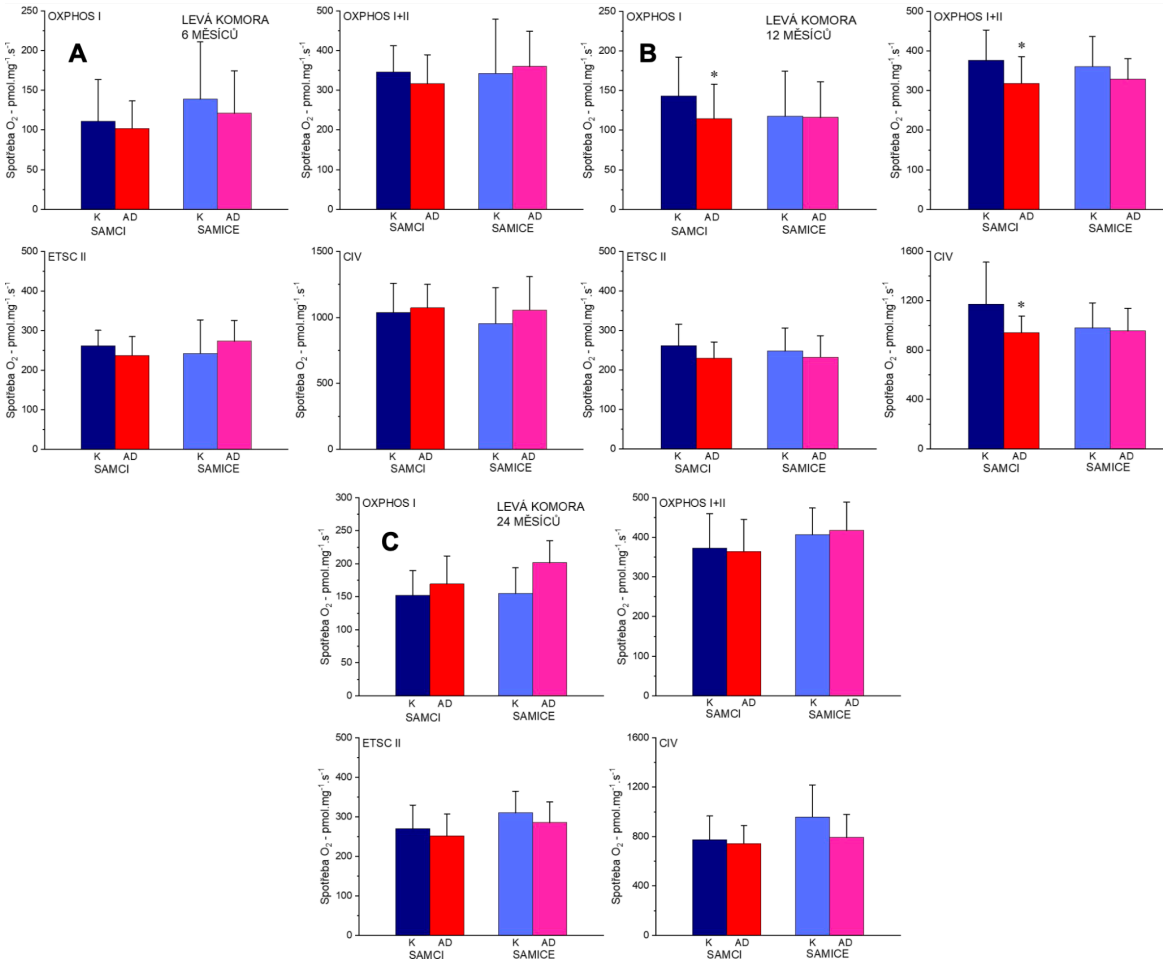
Obrázek 12 – Mitochondriální respirační parametry vzorků HIPOKAMPU samců a samic odebraných z 6- (A), 12- (B) a 24měsíčních (C) AD a kontrolních potkanů
Respirační stavy jsou vyjádřené v pmol·s^{-1}·mg^{-1}. K = kontroly, potkani F344 Fisher; AD = transgenní potkani TgF-344 AD. OXPHOS = aktivní fosforylační respirační stav se substráty poskytujícími elektrony komplexu I malátem, glutamátem a pyruvátem a ADP (OXPHOS-I), sukcinátem (OXPHOS-I+II); ETSC-II = elektrontransportní kapacita po aplikaci FCCP a rotenonu; CIV = respirační kapacita komplexu IV.
Symbol * značí $p < 0,05$ ve srovnání s odpovídajícími kontrolami.

V mozečku ve věku 6 měsíců jsme nepozorovali rozdíly v mitochondriálních respiračních parametrech mezi kontrolními a transgenními zvířaty. Ve 12 měsících jsme prokázali signifikantně nižší spotřebu kyslíku ve stavech OXPHOS-I, OXPHOS-I+II a CIV u transgenních samců proti kontrolám, zatímco u samic jsme rozdíly nezaznamenali. Ve věku 24 měsíců jsme mezi skupinami nenalezli žádné rozdíly v mitochondriální respiraci (obrázek 13).



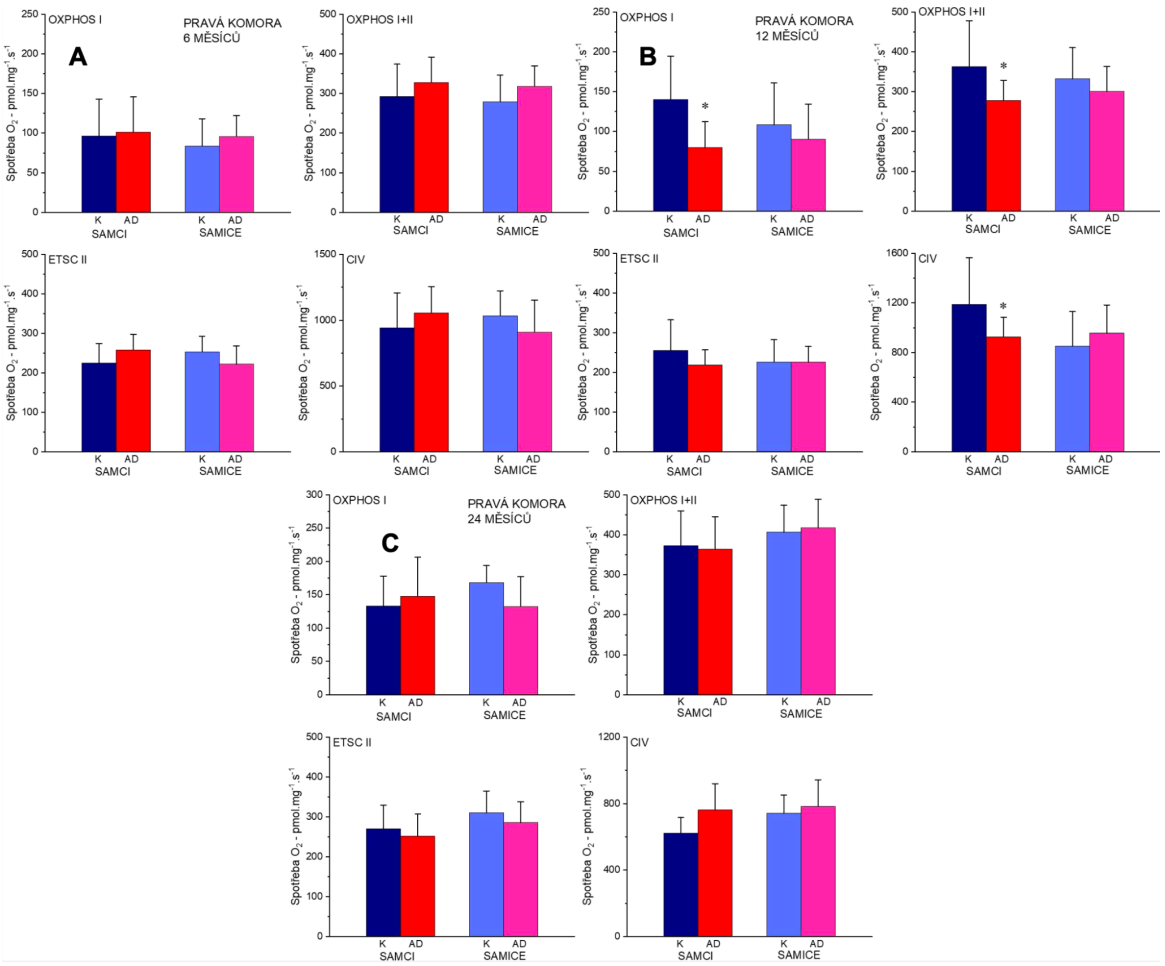
Obrázek 13 – Mitochondriální respirační parametry vzorků MOZEČKU samců a samic odebraných z 6- (A), 12- (B) a 24měsíčních (C) AD a kontrolních potkanů
Respirační stavy jsou vyjádřené v pmol·s^{-1}·mg^{-1}. K = kontroly, potkani F344 Fisher; AD = transgenní potkani TgF-344 AD. OXPHOS = aktivní fosforylační respirační stav se substráty poskytujícími elektrony komplexu I malátem, glutamátem a pyruvátem a ADP (OXPHOS-I), sukcinátem (OXPHOS-I+II); ETSC-II = elektrontransportní kapacita po aplikaci FCCP a rotenonu; CIV = respirační kapacita komplexu IV.
Symbol * značí $p < 0,05$ ve srovnání s odpovídajícími kontrolami.

Zajímali jsme se také, zda čistě genetický model AD může způsobit mitochondriální dysfunkci v periferních orgánech. U 24měsíčních potkanů jsme stanovili respirační parametry v myokardu levé a pravé komory a v játrech, tedy orgánech s vysokou spotřebou kyslíku; u 6- a 12měsíčních potkanů jsme měření rozšířili ještě o kosterní sval, kůru ledvin a trombocyty.



Obrázek 14 – Mitochondriální respirační parametry vzorků LEVÉ KOMORY samců a samic odebraných z 6- (A), 12- (B) a 24měsíčních (C) AD a kontrolních potkanů
Respirační stavy jsou vyjádřené v pmol·s^{-1}·mg^{-1}. K = kontroly, potkani F344 Fisher; AD = transgenní potkani TgF-344 AD. OXPHOS = aktivní fosforylační respirační stav se substráty poskytujícími elektrony komplexu I malátem, glutamátem a pyruvátem a ADP (OXPHOS-I), sukcinátem (OXPHOS-I+II); ETSC II = elektrontransportní kapacita po aplikaci FCCP a rotenonu; CIV = respirační kapacita komplexu IV.
Symbol * značí $p < 0,05$ ve srovnání s odpovídajícími kontrolami.

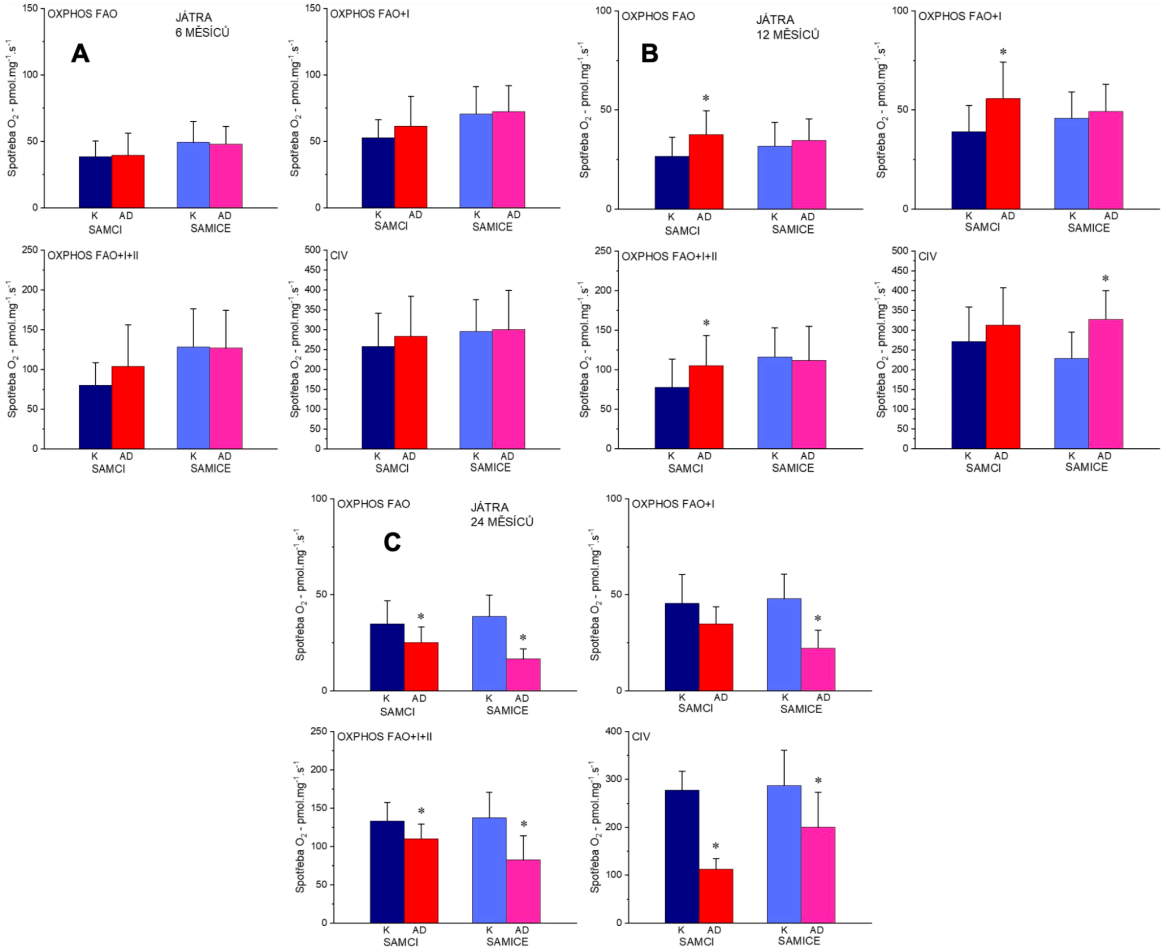
Mitochondriální spotřeba kyslíku měla obdobný charakter v myokardu obou komor. Žádné rozdíly jsme nezjistili ve věku 6 měsíců mezi kontrolními a transgenními potkany, u 12měsíčních AD samců byla mitochondriální respirace signifikantně nižší ve stavech OXPHOS-I, OXPHOS-I+II a CIV v porovnání s kontrolami a ve věku 24 měsíců jsme žádné rozdíly nezaznamenali ani u samců, ani u samic (obrázek 14 a 15).



Obrázek 15 – Mitochondriální respirační parametry vzorků PRAVÉ KOMORY samců a samic odebraných z 6- (A), 12- (B) a 24měsíčních (C) AD a kontrolních potkanů

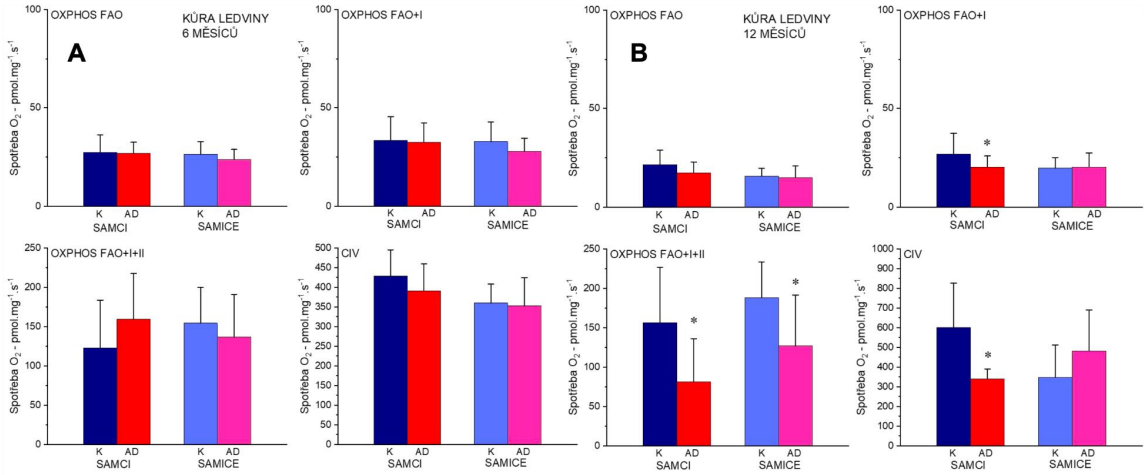
Respirační stavy jsou vyjádřené v pmol·s^{-1}·mg^{-1}. K = kontroly, potkani F344 Fisher; AD = transgenní potkani TgF-344 AD. OXPHOS = aktivní fosforylační respirační stav se substráty poskytujícími elektrony komplexu I malátem, glutamátem a pyruvátem a ADP (OXPHOS I), sukcinátem (OXPHOS I+II); ETSC II = elektrontransportní kapacita po aplikaci FCCP a rotenonu; CIV = respirační kapacita komplexu IV. Symbol * značí $p < 0,05$ ve srovnání s odpovídajícími kontrolami.

V játrech experimentálních potkanů se mitochondriální respirační parametry vyvíjely v čase významně rozdílně. Ve věku 6 měsíců jsme žádné rozdíly mezi zdravými a nemocnými potkany nezaznamenali, ale ve věku 12 měsíců jsme naměřili signifikantně vyšší mitochondriální respiraci u transgenních samců ve stavech OXPHOS-FAO, OXPHOS-FAO+I a OXPHOS-FAO+I+II a ve stavu CIV u transgenních samic. U 24měsíčních zvířat jsme zaznamenali signifikantně nižší respiraci u transgenních samců i samic v porovnání s odpovídajícími kontrolami (obrázek 16).



Obrázek 16 – Mitochondriální respirační parametry vzorků JATER samců a samic odebraných z 6- (A), 12- (B) a 24měsíčních (C) AD a kontrolních potkanů.
Respirační stavy jsou vyjádřené v pmol·s^{-1}·mg^{-1}. K = kontroly, potkani F344 Fisher; AD = transgenní potkani TgF-344 AD. OXPHOS = aktivní fosforylační respirační stav s palmitoyl-L-karnitinem (OXPHOS-FAO), substráty poskytujícími elektrony komplexu I malátem, glutamátem a pyruvátem a ADP (OXPHOS FAO+I), sukcinátem (OXPHOS FAO+I+II); CIV = respirační kapacita komplexu IV.
Symbol * značí $p < 0,05$ ve srovnání s odpovídajícími kontrolami.

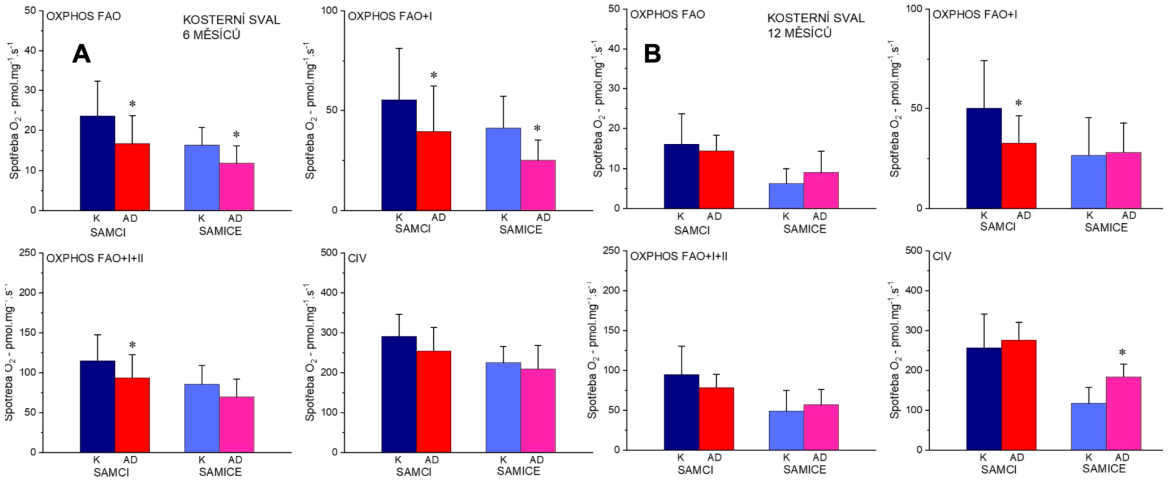
Při hodnocení mitochondriální respirace kůry ledvin jsme neprokázali žádné rozdíly mezi nemocnými a zdravými zvířaty ve věku 6 měsíců. Ve 12 měsících byly stavy OXPHOS-FAO+I, OXPHOS-FAO+I+II a CIV významně nižší u transgenních samců a stav OXPHOS-FAO+I+II u transgenních samic ve srovnání s kontrolami (obrázek 17).



Obrázek 17 – Mitochondriální respirační parametry vzorků KŮRY LEDVIN samců a samic odebraných z 6- (A) a 12měsíčních (B) AD a kontrolních potkanů.
Respirační stavy jsou vyjádřené v pmol·s^{-1}·mg^{-1}. K = kontroly, potkani F344 Fisher; AD = transgenní potkani TgF-344 AD. OXPHOS = aktivní fosforylační respirační stav s palmitoyl-L-karnitinem (OXPHOS-FAO), substráty poskytujícími elektrony komplexu I malátem, glutamátem a pyruvátem a ADP (OXPHOS FAO+I), sukcinátem (OXPHOS FAO+I+II); CIV = respirační kapacita komplexu IV.
Symbol * značí $p < 0,05$ ve srovnání s odpovídajícími kontrolami.

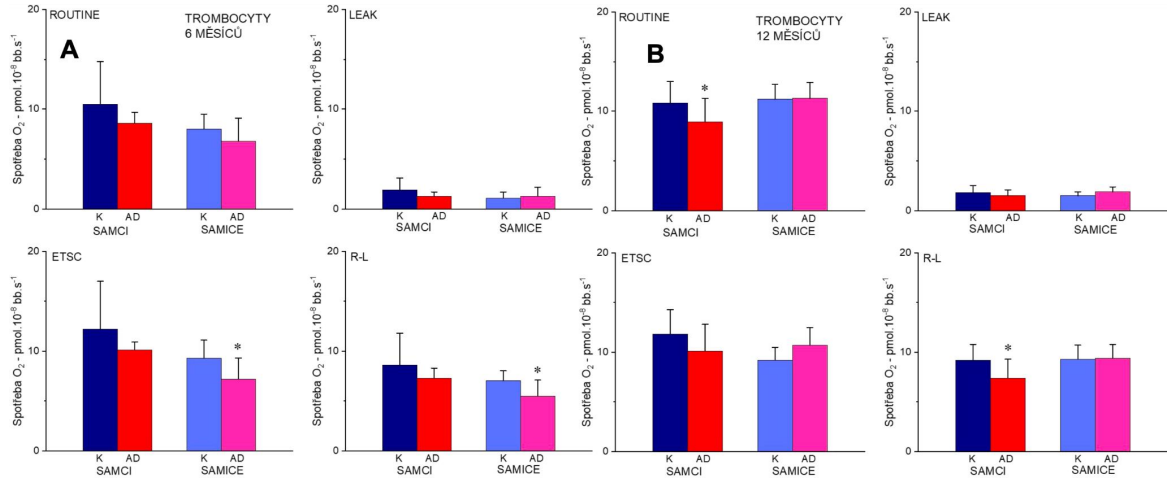
V kosterní svalovině jsme prokázali statisticky významné rozdíly už ve věku 6 měsíců, a to u samců i samic (obrázek 18). Respirační stavy OXPHOS-FAO, OXPHOS-FAO+I a OXPHOS-FAO+I+II byly signifikantně nižší u transgenních samců a stavy OXPHOS-FAO a OXPHOS-FAO+I u transgenních samic ve srovnání s odpovídajícími kontrolami. Ve věku 12 měsíců jsme naměřili pouze statisticky významně nižší respiraci ve stavu OXPHOS-FAO+I u AD samců v porovnání s kontrolami.

Analýza mitochondriální respirace intaktních trombocytů nepřinesla konzistentní výsledky, ale ve věku 6 měsíců bylo možné pozorovat trend ke snížení spotřeby kyslíku ve stavech ROUT, ETSC a R-L u transgenních potkanů, ale statistické významnosti dosáhl jen u samic ve stavech ETSC a R-L. Ve věku 12 měsíců nebyl u samic mezi oběma skupinami nalezen žádný rozdíl, u AD samců byly signifikantně nižší stavy ROUT a R-L (obrázek 19).



Obrázek 18 – Mitochondriální respirační parametry vzorků KOSTERNÍ SVALOVINY samců a samic odebraných z 6- (A) a 12měsíčních (B) AD a kontrolních potkanů

Respirační stavy jsou vyjádřené v pmol·s^{-1}·mg^{-1}. K = kontroly, potkani F344 Fisher; AD = transgenní potkani TgF-344 AD. OXPHOS = aktivní fosforylační respirační stav s palmitoyl-L-karnitinem (OXPHOS-FAO), substráty poskytujícími elektrony komplexu I malátem, glutamátem a pyruvátem a ADP (OXPHOS-FAO+I), sukcinátem (OXPHOS-FAO+I+II); CIV = respirační kapacita komplexu IV.
Symbol * značí $p < 0,05$ ve srovnání s odpovídajícími kontrolami.



Obrázek 19 – Mitochondriální respirace intaktních TROMBOCYTŮ samců a samic odebraných z 6- (A) a 12měsíčních (B) AD a kontrolních potkanů

Respirační stavy jsou vyjádřené v pmol·s^{-1}·mg^{-1}. K = kontroly, potkani F344 Fisher; AD = transgenní potkani TgF-344 AD. ROUTINE = základní respirace; LEAK = respirace nutná k udržení mitochondriálního membránového potenciálu; ETSC = kapacita elektrontransportního systému; R-L = spotřeba kyslíku odpovídající oxidativní produkci ATP, tzv. čistá základní respirace.
Symbol * značí $p < 0,05$ ve srovnání s odpovídajícími kontrolami.

Celkově jsme analyzovali mitochondriální spotřebu kyslíku intaktními trombocyty společně s respiračními parametry sedmi permeabilizovaných vzorků tkání a orgánů u většího počtu kontrolních zvířat (N = 67). Pro stav ETSC, který zrcadlí kapacitu elektrontransportního systému, jsme stanovili Spearmanovy korelační koeficienty ρ. Tento mitochondriální respirační stav, který je obdobný v intaktních i permeabilizovaných buňkách, je pro takovou korelaci nejvhodnější [Rose et al., 2019]. V tabulce 12 jsou tučně vyznačeny statisticky významné korelace stavů ETSC v mozečku a kosterním svalu (p = 0,038) a hipokampu a mozečku (p = 0,017). Hraniční výsledek p jsme nalezli u korelace mezi pravou a levou komorou (p = 0,06). Stav ETSC trombocytů nekoreloval se stejným stavem změřeným v jakékoliv námi analyzované tkáni s hodnotami p od 0,16 do 0,74.

Tabulka 12 – Spearmanovy korelační koeficienty ρ pro stav ETSC v analyzovaných buňkách a tkáních kontrolních potkanů

	TRO	HIPO	LK	PK	CEREB	SVAL	LED	JÁTRA
TRO	1	0,202	0,0503	0,108	0,193	0,164	-0,081	-0,105
HIPO	0,202	1	0,003	0,159	**0,310**	0,157	0,144	0,0156
LK	0,050	0,003	1	0,252	0,182	0,193	0,015	-0,146
PK	0,108	0,159	0,252	1	0,055	0,153	0,097	-0,211
CEREB	0,193	**0,310**	0,182	0,055	1	**0,271**	0,255	0,108
SVAL	0,164	0,157	0,193	0,153	**0,271**	1	-0,012	-0,161
LED	-0,081	0,144	0,015	0,097	0,255	-0,012	1	0,127
JÁTRA	-0,105	0,016	-0,146	-0,211	0,108	-0,161	0,127	1

Tučně jsou vyznačeny signifikantní korelace, kurzívou hraniční p = 0,06. TRO = trombocyty; HIPO = hipokampus; LK = levá komora; PK = pravá komora; CEREB = cerebellum; LED = kůra ledviny.

2.5 Diskuse

2.5.1 Diskuse vztahující se k cíli 1

První hypotéza disertační práce se vztahovala k prevalenci objektivně měřitelné kognitivní dysfunkce pomocí MoCA testu s předpokladem, že v populaci zdatných a nezávislých seniorů bude prevalence měřitelné kognitivní dysfunkce relativně nízká. Dle Alzheimer Europe je v obecné evropské populaci odhadovaná prevalence syndromu demence 3,3 % ve věkové skupině 70–74 let, 8,0 % ve skupině 75–79 let, 12,1 % ve skupině 80–84 let, 21,9 % ve skupině 85–89 let a 40,8 % u osob starších 90 let [Alzheimer Europe, 2019]. K tomu je nutné přidat odhadovanou prevalenci osob s MCI. Ve věku 65–69 let jde o 6,7 % osob, ve věku 70–74 let o 10,1 %, ve věku 75–79 let o 14,8 %, ve věku 80–84 let o 25,2 % a ve věku nad 85 let již o 37,6 % [Petersen et al., 2018]. Námi odhadovaná prevalence kognitivní dysfunkce v souboru (celkově 40 %; ve věku 80+ přes 70 %) se přes obecně vysokou prevalenci MCI a syndromu demence ve vyšším věku jeví jako nepřiměřeně vysoká, obzvlášť vzhledem k charakteru testované populace. Na jedné straně lze říci, že tento neočekávaně vysoký podíl osob s pozitivním výsledkem MoCA testu ukazuje, že i mezi osobami, které si zachovávají svou soběstačnost a většinou také dobrou fyzickou zdatnost, se může vyskytovat nezanedbatelný podíl jedinců s dosud nediagnostikovanou kognitivní dysfunkcí. Na straně druhé se nabízí hned několik možných faktorů zkreslení výsledku. Tím pravděpodobně nejvýznamnějším je zvolený způsob testování kognice. Pro potřeby našeho výzkumu jsme zvolili screeningový test MoCA, který byl vyvinut v roce 2005 kanadskými vědci [Nasreddine et al., 2005]. Výhodou je jeho univerzální využití, které není omezené na detekci kognitivní dysfunkce u AD. Lze jej účinně vyhodnocovat také u všech dalších nejčastějších etiopatogenetických typů kognitivních poruch [Freitas et al., 2012; Coleman et al., 2016; Biundo et al., 2016]. Jedná se o relativně krátký test, který prokázal dobrou výtěžnost nejen u pacientů s již rozvinutým syndromem demence, ale na rozdíl od obecně nejvyužívanějšího screeningového testu MMSE prokázal relativně vysokou senzitivitu v záchytu MCI. V originální studii Nasreddinové a kol. [2005] byla určena hraniční hodnota 25/26, která prokazovala optimální poměr mezi senzitivitou a specificitou testu (90 % a 87 %). Pro testování souboru jsme zvolili tuto primárně navrženou cut-off hodnotu a záměrně jsme neprováděli korekci na věk. Tento přístup byl zvolen z důvodu, že naším cílem bylo zajistit skutečně kognitivně zdravou kontrolní skupinu pro další výzkum, tj. preferovali jsme vysokou senzitivitu testu před specificitou. Fakt, že některé studie poukazují na příliš vysoké riziko falešně pozitivních výsledků při takto nastaveném cut-off skóru, byl pro účel našeho

testování přijatelný. Například dle studie Rossettiové a kol. [2011], která testovala 2653 do té doby kognitivně intaktních osob, byla naměřena průměrná hodnota MoCA skóru 23,4 a více než 60 % kognitivně zdravých osob bylo falešně zařazeno mezi osoby s kognitivní dysfunkcí. Dle nedávných metaanalýz je optimálním rozpětím cut-off hodnot ≤ 23, ≤ 24 nebo ≤ 25 [Carson et al., 2018; Islam et al., 2023]. Dle Islama a kol. [2023] se specificita MoCA testu v originální podobě pohybovala na úrovni 58,8 %. Existují ovšem studie, které podporují původní cut-off hodnotu [Sun et al., 2023]. Lze spekulovat, že hraje roli celá řada vzájemně se prolínajících vlivů, např. způsob testování, zvolená populace, geografické rozdíly aj. V českém prostředí byla publikována normativní data s adjustací na věk a vzdělání, ke kterým je vhodné přihlédnout v klinické praxi [Kopeček et al., 2017]. Tabulka 13 ukazuje distribuci pozitivních a negativních výsledků MoCA dle určeného cut-off skóru pro náš soubor.

Tabulka 13 – Frekvence pozitivních a negativních výsledků MOCA testu v závislosti na použitém cut-off skóru (cut-off skór v tabulce značí nejmenší možný skór akceptovaný jako negativní, tj. absenci poruchy)

Cut-off skór	Procento pacientů s negativním výsledkem testu	Procento pacientů s pozitivním výsledkem testu
20	94	6
21	94	6
22	93	7
23	91	9
24	87	23
25	70	30
26	60	40
27	51	49
28	33	67
29	21	78
30	13	87

Test MMSE prokázal přes vysokou zvolenou cut-off hodnotu nižší záchyt suspektní kognitivní poruchy v souboru (21,4 %), což odpovídá všeobecně uznávanému faktu, že MoCA je v detekci MCI senzitivnějším screeningovým nástrojem [Ciesielska et al., 2016]. Návazné komplexní vyšetření reprezentativního vzorku postižených jedinců z našeho souboru, zaměřené na definitivní diagnostiku přítomnosti, typu a závažnosti kognitivní poruchy, se bohužel nepodařilo realizovat v důsledku pandemie COVID-19. Z tohoto důvodu jsme byli nuceni upustit od jednoho z vedlejších cílů studie, kterým bylo posouzení reliability testů MMSE a MoCA u naší specifické skupiny seniorů.

Přes průměrný věk 76,2 let jsme pomocí baterie SPPB naměřili vysokou míru fyzické zdatnosti v našem souboru (10,7), což lze dokumentovat například ve srovnání s početnou a náhodně zvolenou populací komunitně žijících seniorů s průměrným věkem 69,2 let, kde hodnota SPPB dosahovala v průměru 8,8 [Ramírez-Vélez et al., 2021]. Vztah mezi fyzickou aktivitou a zdatností a kognitivními funkcemi je mnohovrstevnatý a obousměrný. Fyzická inaktivita je považována za jeden z dvanácti nejvýznamnějších ovlivnitelných rizikových faktorů rozvoje syndromu demence a představuje prostor k intervencím [Livingston et al., 2020]. Také pacienti s MCI profitují z fyzické aktivity. Bylo prokázáno, že kombinace aerobních a silových aktivit a mentálního tréninku vedla k signifikantnímu a časnému zlepšení kognitivních funkcí [Montero-Odasso et al., 2023]. Vztah mezi kognitivními funkcemi a fyzickou zdatností se v našem souboru potvrdil. Data ukazují, že nižší skórování v MoCA testu bylo asociováno s nižšími výkony v SPPB.

Námi uvedené výsledky dle našeho názoru spíše podporují kontroverze ohledně plošného screeningu kognitivních funkcí u seniorů, zejména z důvodu rizika falešně pozitivních výsledků. Bezpochyby velmi záleží na způsobu testování. Námi využitý test MoCA s přísně nastavenou cut-off hodnotou se jako vhodný nejeví pro pravděpodobně nízkou specificitu. V ČR využívaný screeningový test Mini-Cog disponuje senzitivitou 76 % a specificitou 73 % dle zahraničních dat [Holsinger et al., 2012]. Dle rozsáhlé metaanalýzy, která se zabývala Mini-Cog testem v roli screeningového nástroje, není doporučen k plošnému využití v neselektované starší populaci [Seitz et al., 2021]. Na straně druhé se domníváme, že klinicky uvážlivé testování kognice u vybraných skupin seniorů je zcela na místě, neboť včasný záchyt kognitivní poruchy umožní adekvátní plánování a vedení komplexní péče. Za klíčovou považujeme zejména srozumitelnou komunikaci ohledně výsledků s pacientem a jeho blízkými, která může dle našeho názoru výrazně redukovat riziko stigmatizace a psychické dekompenzace pacienta.

2.5.2 Diskuse vztahující se k cíli 2

V této části studie jsme hodnotili mitochondriální respiraci krevních destiček odebraných od mladších a starších osob obou pohlaví, a to pomocí dvou metod, respirometrie s vysokým rozlišením (O2k) a metabolické analýzy na přístroji Seahorse. To nám umožnilo srovnat výsledky obou metod a také odhadnout produkci ATP oxidativní a glykolytickou metabolickou cestou. Pomocí O2k jsme měřili spotřebu kyslíku v permeabilizovaných destičkách, což umožnilo sekvenční stanovení fosforylačních a elektrontransportních kapacit respiračních komplexů. Hodnocení mitochondriální respirace u intaktních trombocytů bylo použito k odhadu bioenergetického profilu trombocytů připomínajících podmínky *in vivo* [Pesta a Gnaiger, 2012]. Paralelně prováděná metabolická analýza Seahorse na stejných krevních destičkách nám umožnila porovnat bazální spotřebu kyslíku, stav LEAK po přidání oligomycinu a reziduální spotřebu spotřebu kyslíku s odpovídajícími respiračními stavy získanými pomocí O2k, tj. se stavy ROUTINE, LEAK a ROX a vyhodnotit rychlost produkce ATP pomocí ověřené metody [Mookerjee et al., 2017]. Pro použití izolovaných krevních destiček jsme se rozhodli ze dvou důvodů: 1. Postup izolace krevních destiček je rychlejší a jednodušší než izolace mononukleárních buněk periferní krve (PBMC; z anglického peripheral blood mononuclear cells) nebo dokonce jednotlivých podtypů bílých krvinek; 2. Krevní destičky, i když jsou bezjaderné, představují relativně homogenní zdroj mitochondrií na rozdíl od PBMC, které se skládají z monocytů a lymfocytů, jež mají různé bioenergetické profily [Chacko et al., 2013].

Obecně se uznává, že stárnutí je spojeno s poklesem mnoha mitochondriálních funkcí včetně spotřeby kyslíku a produkce ATP [Boengler et al., 2017]. Existuje dostatek důkazů o snížené mitochondriální respiraci pro stárnoucí kosterní sval. Četné studie dokumentovaly klesající rychlost produkce ATP, zvýšenou permeabilitu vnitřní mitochondriální membrány pro H^+, sníženou kapacitu elektrontransportního systému nebo sníženou aktivitu komplexů I a IV [Boffoli et al., 1994; Cooper et al., 1992; Navarro a Boveris, 2007; Porter et al., 2015]. Podobné nálezy byly zjištěny také v srdci, mozku, játrech nebo ledvinách [Choksi et al., 2011; Ojaimi et al., 1999]. Studie o poklesu mitochondriální respirace krevních destiček nebo tvorby ATP souvisejícího s věkem jsou mnohem méně četné. V práci Sjovalla a kol. [2013] provedené na intaktních a permeabilizovaných trombocytech dospělých ve věku 19–65 let a dětí (1 měsíc až 12 let) byla mitochondriální spotřeba kyslíku měřena respirometrií s vysokým rozlišením (O2k). Respirační stav ROUT (tj. základní klidová respirace) vykazoval tendenci

se s věkem zvyšovat, zatímco spotřeba kyslíku ve stavu ETSC (tj. stavu odpovídající celkové kapacitě systému přenášet elektrony) vykazovala spíše opačný trend. Tyto změny byly ale přisuzovány zejména odlišným vlastnostem mitochondriální respirace u zahrnutých dětí. V naší studii jsme respirometricky stanovili srovnatelné absolutní hodnoty u intaktních i permeabilizovaných trombocytů. Některé statisticky významné rozdíly jsme však identifikovali. Krevní destičky skupiny ST1A vykazovaly výrazně nižší stavy odrážející rozpřaženou respiraci, tj. ETSC-FAO+I+II, EII, CIV a ETSC než skupina ML. Kromě nižší ETSC vykazovaly intaktní krevní destičky izolované od starších účastníků také nižší bazální dýchání (stav ROUT), spotřebu kyslíku vázanou na produkci ATP (R-L) a rezervní kapacitu (E-R) než ty izolované od mladších dárců. Tento rozdíl mohl souviset s věkem našich starších dobrovolníků (minimálně 70 let) ve srovnání se švédskou studií (maximálně 65 let). V jiné práci provedené na krevních destičkách izolovaných od mladých (18–35 let) a starších (86–93 let) dospělých pomocí metabolické analýzy Seahorse byly bazální OCR a OCR vázané na ATP nižší u starší populace, což je v souladu s naší studií [Braganza et al., 2019].

Relativní příspěvek procesů generujících ATP v krevních destičkách (tj. glykolýza a oxidační fosforylace) je stále předmětem diskuse. Podle publikovaných údajů tvoří mitochondriální produkce ATP 35–85 % přeměny energie a glykolýza zbývajících 15–65 % [Kilkson et al., 1984; Ravi et al., 2015; Akkerman a Holmsen, 1981]. Výsledky naší studie ukazují, že mitochondriální produkce ATP představovala 75 % celkové syntézy ATP u mladých dospělých a že u starších osob byl tento podíl významně snížen. Naproti tomu přeměna energie spojená s glykolýzou byla dobře zachována i v pokročilém věku. Pozitivní významná korelace mezi parametrem R-L měřeným v intaktních buňkách pomocí respirometrie (O2k) a mitochondriální produkcí ATP stanovenou metabolickým analyzátorem Seahorse potvrzuje, že tuto proměnnou lze brát jako hrubý odhad produkce ATP v mitochondriích i při použití respirometrie s vysokým rozlišením a potvrzuje dobrou kompatibilitu obou metod. Studie zabývající se vlivem stárnutí na produkci ATP v krevních destičkách jsou vzácné. Shi a kol. [2008] nezaznamenali žádný rozdíl v obsahu ATP v trombocytech mezi mladými a starými zdravými jedinci, jiní odvozovali klesající produkci ATP s rostoucím věkem v krevních destičkách ze spotřeby kyslíku [Braganza et al., 2019].

Přestože obě metody použité pro hodnocení mitochondriální respirace a extramitochondriální produkce ATP v této studii poskytly srovnatelné výsledky, je třeba poznamenat, že mitochondriální spotřeba kyslíku měřená pomocí analyzátoru Seahorse byla významně vyšší než odpovídající mitochondriální parametry získané

pomocí respirometrie O2k. Domníváme se, že by to mohlo souviset s odlišným stavem krevních destiček v komůrkách oxygrafu O2k, kde se krevní destičky kontinuálně míchají a během testu je možné kontrolovat jejich potenciální agregaci, a analyzátoru Seahorse, kde se trombocyty musí přilepit na dno jamky a nelze vyloučit jejich alespoň částečnou mechanickou aktivaci [Qiu et al., 2014].

Dalším úskalím je nábor kontrolních dobrovolníků v pokročilém věku [Malay a Chung, 2012; Mody et al., 2008]. Jak bylo uvedeno výše, v této studii pouze 4 účastníci uvedli, že nemají žádnou důležitou osobní anamnézu a neužívají žádné léky a zároveň test MoCA neprokázal podezření na kognitivní deficit. Do jaké míry lze takový výběr považovat za reprezentativní kontrolní skupinu je sporné, neboť mitochondriální parametry destiček jsou považovány za potenciální marker různých onemocnění a zároveň jsou citlivé na podávanou farmakoterapii. Změny v mitochondriální respiraci trombocytů byly zjištěny u řady onemocnění, která typicky souvisí s nemocností vyššího věku [Petruş et al., 2019; Wang et al., 2017a].

Závěrem této části lze konstatovat, že jsme ověřili snížení mitochondriálních respiračních parametrů a oxidativní produkce ATP v krevních destičkách starších osob. Naše studie navíc dokumentuje dobrou kompatibilitu dvou nejpoužívanějších metod pro stanovení globální výkonnosti systému transportu elektronů, tedy vysoce účinné respirometrie O2k a metabolické analýzy Seahorse [Jedlička et al., 2021].

2.5.3 Diskuse vztahující se k cíli 3

Třetí cíl disertační práce jsme věnovali mitochondriální respiraci destiček pacientů se syndromem demence. Během posledního desetiletí prozkoumala řada studií potenciální využití mitochondriální analýzy buněk periferní krve k posouzení celkového mitochondriálního stavu orgánů, které nejsou dostupné in vivo [Petruş et al., 2019]. Podle některých autorů může hodnocení bioenergetické funkce cirkulujících buněk pomoci při hledání snadno detekovatelných biomarkerů při včasné diagnostice neurodegenerativních nebo zánětlivých onemocnění [Fišar et al., 2016; Sjovall et al., 2013] a/nebo sledování účinků terapeutických intervencí, jako je fyzický trénink [Gatterer et al., 2018] nebo dieta [Bajracharya et al., 2019]. Výsledky mnoha studií jsou však rozporuplné a ukazují buď významné korelace mezi bioenergetickými parametry krevních buněk a různých orgánů [Tyrrell et al., 2016; Braganza et al., 2019], nebo neuvádějí žádný vztah mezi mitochondriálními respiračními proměnnými měřenými v cirkulujících buňkách a kosterním svalu [Hedges et al., 2019; Rose et al., 2019].

V této části studie jsme se zaměřili na stanovení mitochondriální respirace izolovaných trombocytů pacientů se stanovenou diagnózou syndromu demence jakékoliv etiologie. Vzhledem k tomu, že vzorky jsme začali shromažďovat koncem roku 2019 a v roce 2020 vypukla pandemie Covid-19, byla tato část projektu značně omezena protiepidemickými opatřeními v následujících letech. Podařilo se nám získat krevní vzorky od 16 nemocných, což je ale číslo srovnatelné s jinými dosud publikovanými studiemi [Mahapatra et al., 2023].

Ukázalo se však, že největším problémem je získat a definovat relevantní kontrolní skupinu v odpovídajícím věku. Nečetné studie dokumentující sníženou mitochondriální spotřebu kyslíku v trombocytech pacientů trpících různými typy demencí většinou kontrolní skupinu definují věkem, nepřítomností jiné neurologické diagnózy a v případě dalších onemocnění jejich kompenzací (arteriální hypertenze, diabetes mellitus, ICHS aj.) [Mancuso et al., 2003; Fišar et al., 2016, 2019a, 2019b; Mahapatra et al., 2023]. Nezmiňují farmakologickou anamnézu účastníků studie, i když celá řada léků má na mitochondriální respiraci významný pozitivní i negativní vliv [Bețiu et al., 2022].

Problematikou referenčních skupin v klinických výzkumech se zabývá řada studií, které poukazují na nízkou účast seniorů navzdory faktu, že v seniorském věku je potřeba zdravotní péče nejvyšší. Problematická je multimorbidita, polypragmazie, opuštění studie z důvodu onemocnění, hospitalizace nebo smrti, ale častou překážkou může být i nedostupnost místa výzkumu, nutnost doprovodu, sebepodceňování seniorů a mnohé jiné příčiny. Selekce seniorů bez medikace a dalších onemocnění je časově a finančně náročná a vybraná skupina pak může být nedostatečně reprezentativní pro celou populaci [Pitkala a Strandberg, 2022].

V této části práce jsme proto definovali kontrolní skupinu jako soběstačné, pokud možno aktivní seniory bez kognitivního deficitu (ověřeno testování pomocí MoCA). Osobní a farmakologická anamnéza nebyly zohledněny. Podmínkou byl kompenzovaný stav přidružených onemocnění.

Výsledky předchozích studií zabývajících se mitochondriální respirací trombocytů u demencí různé etiologie jsou velmi rozporuplné, nicméně celkem shodně uvádějí asociaci mitochondriální funkce s klinickými rysy syndromu demence, zejména na podkladě AD. V nejstarší studii Mancusa a kol. [2003], kde byla diagnóza AD stanovena klinicky na základě soudobých platných kritérií [McKhann et al., 1984], byla spektrofotometricky měřena aktivita cytochrom-c-oxidázy (COX, komplexu IV) v trombocytech pacientů s pravděpodobnou diagnózou

Alzheimerovy nemoci a věkově odpovídajících kontrol. Bylo zjištěno, že aktivita COX byla v destičkách dementních pacientů snížena o 26,2 % ve srovnání s kontrolními vzorky, ale že tato aktivita nekorelovala s výsledky kognitivních testů (MMSE). Snížená aktivita komplexu IV v trombocytech pacientů se suspektní AD byla potvrzena také v práci autorů Cardosa a kol. [2004]. Ve studii Fišara a kol. [2019a] sice nebyla zaznamenána změna aktivity komplexu IV v souvislosti s demencí, ale byla nalezena významná asociace mezi aktivitou tohoto komplexu a body získanými v kognitivních testech. V naší práci jsme zaznamenali signifikantně nižší aktivitu komplexu IV v intaktních destičkách dementních pacientů.

Jen 3 předchozí studie analyzovaly mitochondriální aktivitu trombocytů stejnou metodou, tj. respirometrií s vysokým rozlišením, ve vztahu ke komplexnímu neuropsychologickému kognitivnímu testování, objemu hipokampu, morfologickým změnám v bílé hmotě, měřeným změnám funkčního stavu aj. [Fišar et al., 2019a; Fišar et al., 2019b; Mahapatra et al., 2023]. Jejich výsledky se v mnohém odlišují navzájem i od našich měření. V intaktních ani permeabilizovaných trombocytech Mahapatra a kol. nenašli žádné rozdíly v měřených respiračních stavech mezi trombocyty odebranými od kontrolních a dementních pacientů, ale u pacientů s mírnou kognitivní poruchou byl pozorován trend ke vzestupu v porovnání s kontrolami ve stavech ETSC, OXPHOS-FAO+I+II a ETSC-FAO+I+II. Slabé, ale signifikantní asociace byly odhaleny mezi stavem ROUTINE a hyperintenzitami bílé hmoty (-0,17) a objemem hipokampu (0,24) a mezi stavem LEAK-FAO a výsledky kognitivních testů (0,15).

V jedné studii Fišara a kol. [2019a] byl zkoumán vztah mitochondriální respirace permeabilizovaných trombocytů u pacientů s AD, AD a přidruženou depresí nebo samotnou depresí k výsledkům MMSE a Hamiltonovy škály pro hodnocení deprese. Byla zjištěna zvýšená kapacita komplexu I u pacientů s AD s významnou negativní korelací s výsledkem MMSE. Statisticky významná asociace byla zjištěna také mezi kapacitou komplexu II, komplexu IV a MMSE. Nicméně korelace mezi kapacitou komplexu IV a Hamiltonovou škálou pro hodnocení deprese byla zjištěna i u neléčených depresivních pacientů, takže se nejedná o nález specifický pro AD.

Další studie stejné skupiny [Fišar et al., 2019b] se zabývala mitochondriální spotřebou kyslíku v intaktních a permeabilizovaných trombocytech pacientů s diagnózou AD podpořenou magnetickou rezonancí. Všichni pacienti užívali inhibitory acetylcholinesterázy a/nebo antagonisty NMDA receptorů. Pacienti měli ve srovnání s kontrolami nižší respiraci ve stavech ROUT (bazální spotřeba O_2)

a ETSC, žádné změny nebyly identifikovány v mitochondriální spotřebě kyslíku v permeabilizovaných trombocytech, kromě zvýšeného stavu LEAK. Asociace byly zjištěny mezi stavem ROUT a MMSE a některými vypočtenými parametry a hladinou amyloidových peptidů nebo jejich poměrem.

Naše práce přinesla v některých aspektech odlišné výsledky: vyšší stav ETSC intaktních trombocytů, vyšší rezerva (E-R), nižší stav LEAK a nižší aktivita CIV (srovnání DEM vs ST1). I zde se ukazuje obtížnost sestavení výběrového souboru kontrolních jedinců, neboť při porovnání výsledků se souborem ST1A byl charakter rozdílů respirace mezi zdravými a nemocnými probandy shodný jako v práci Mahapatry et al. [2023], tj. žádné významné rozdíly nebyly zjištěny kromě statisticky významně nižší aktivity CIV.

Zajímavější výsledky ukázalo měření mitochondriální spotřeby kyslíku v permeabilizovaných trombocytech, které vykazovalo nejen nižší respirační kapacitu ve stavech OXPHOS-FAO+I a ETSC-II u pacientů trpících demencí, ale také rozdíly v poměrech L-OMY/ETSC-FAO+I+II, OXPHOS-FAO/OXPHOS-FAO+I, OXPHOS-FAO+I/OXPHOS-FAO+I+II, ETSC-II/ETSC-FAO+I+II, které poukazují na možné metabolické reprogramování trombocytů u pacientů trpících demencí indikující zvýšený podíl metabolismu mastných kyselin, nižší kapacitu komplexu I i II a vyšší rozpřažení oxidace od fosforylace. Je známo, že v mozku pacientů trpících demencí, ale i jinými neurodegenerativními chorobami, dochází ke sníženému metabolismu glukózy [Alavi et al., 1986; Salmon et al., 2024], snížení exprese glukózových transportérů [Simpson et al., 1994] i poruchám metabolismu mastných kyselin [Ju et al., 2024]. Také trombocyty jsou schopné pozoruhodné metabolické plasticity v souvislosti s neurodegenerativními chorobami, i když patofyziologický význam zatím není jasný [Ferrer-Raventós a Beyer, 2021].

I když se role mitochondrií trombocytů jako všeobecného markeru mitochondriální zdatnosti jiných orgánů do budoucna nepotvrdí, námi a ostatními autory nalezené asociace mezi kognitivními ukazateli a markery demence dávají určitou naději pro další výzkum v této oblasti v souvislosti s neurodegenerativními chorobami. Bylo například prokázáno, že amyloidové peptidy mají přímý inhibiční vliv na mitochondriální respiraci, což patří mezi další argumenty podporující teorii, že patologie Aβ a funkce mitochondrií jsou úzce provázány [Donner et al., 2021]. V současné době se jako nejnadějnější ukazatel jeví komplex IV, jehož aktivitu lze stanovit relativně jednoduchou spektrofotometrickou metodou a na jehož snížené aktivitě, kapacitě nebo expresi v souvislosti s demencí panuje všeobecná shoda [Morais et al., 2021]. Je však třeba

poznamenat, že mitochondriální dysfunkce není specifickou známkou demence při Alzheimerově chorobě, ale byla identifikována i u dalších typů demencí a jiných neurodegenerativních onemocnění [Fišar et al., 2019b; Garcia-Esparcia et al., 2018; Rahayel et al., 2023]. Mitochondriální dysfunkce destiček byla prokázána také u pacientů trpících srdeční nedostatečností, diabetem mellitem 2. typu nebo chronickým onemocněním ledvin [Shen et al., 2024; Avila et al., 2012; Gvozdjáková et al., 2020], tedy chorobami, které se často vyskytují ve vyšším věku. Dysfunkce mitochondriálního elektrontransportního systému v trombocytech se tedy pravděpodobně nestane diagnostickým ukazatelem demencí, ale může se uplatnit ve výzkumu patofyziologie onemocnění a sledování účinnosti potenciálních terapeutických intervencí.

2.5.4 Diskuse vztahující se k cíli 4

Čtvrtá část práce se věnovala myšlence, zda neurodegenerativní onemocnění včetně AD má vliv na funkci mitochondrií periferních orgánů, a to za využití vybraných tkání potkana s modelovým onemocněním AD.

Je už dlouho známo, že k expresi Aβ dochází v játrech, ledvinách, kosterní a srdeční svalovině, krevních buňkách i jinde [Kitaguchi et al., 1988; Bush et al., 1990]. Dokonce zde dochází i k produkci amyloidových peptidů, i když většina z nich je $A\beta_{1\text{-}40}$ a jsou velmi rychle z cirkulace odstraňovány enzymatickým štěpením, vylučováním játry a ledvinami a přestupem přes hematoencefalickou bariéru do mozku [Ullah et al., 2021].

Koncentrace amyloidových peptidů v mozku je dána nejen jejich syntézou z APP amyloidogenní cestou, ale také jejich odstraňováním enzymatickým štěpením, receptorově zprostředkovanou endocytózou neurony a gliovými buňkami [Yoon a AhnJo, 2012]. Uvádí se, že 40–60 % Aβ peptidů produkovaných v mozku se dostává do periferní krve přestupem přes hematoencefalickou bariéru, filtrací do mozkomíšního moku a glymfatickou cestou [Cheng et al., 2020]. Z uvedeného je patrné, že centrální nerovnováha mezi syntézou a odstraňováním Aβ peptidů může v periferní cirkulaci způsobit zvýšenou koncentraci toxických peptidů a potenciálně tak poškodit periferní orgány [Ullah et al., 2021].

K přesunu Aβ peptidů dochází i opačným směrem, tj. z krve do CNS, kde mohou přispívat k neuropatologickým znakům onemocnění [Bu et al., 2018; Burwinkel et al., 2018].

V naší studii jsme chtěli zachytit případné poruchy mitochondriální respirace v periferních tkáních a orgánech u transgenního modelu Alzheimerovy choroby, kde se dosavadní výzkum soustředil výhradně na projevy onemocnění v mozku pokusných zvířat. Výhodou modelu je komplexní patologicko-anatomický obraz s depozity Aβ, intracelulárními neurofibrilárními klubíčky tvořenými hyperfosforylovaným tau proteinem, neurodegenerací a kognitivním deficitem. Zvýšená exprese Aβ v mozku byla u tohoto modelu zjištěna už ve věku 3 měsíců a tvorba plaků ve 4 měsících [Fang et al., 2023]. Poruchy prostorové paměti a schopnosti navigace byly odhaleny ve věku 4–6 měsíců [Proskauer Pena et al., 2021; Fowler et al., 2022], podobně jako depozita amyloidu v mozkových cévách [Bishay et al., 2022]. U 7měsíčních potkanů byl popsán hypometabolismus glukózy v mozku [Morrey et al., 2025]. Zvýšená hladina lidského Aβ a fosforylovaného tau proteinu byla v plazmě transgenních potkanů prokázána ve věku 8 měsíců [Rutkowsky et al., 2024]. Věk transgenních potkanů, který se považuje za období, kdy je symptomatologie AD plně vyvinuta z funkčního i morfologického hlediska, je 12 měsíců [Bernaud et al., 2022]. Ze 107 publikací na PubMed, které se zabývají tímto transgenním modelem, se nám nepodařilo najít ani jedinou, která by analyzovala vývoj onemocnění v periferních orgánech, ať už funkčními testy, histologickou analýzou nebo molekulárně biologickými metodami.

Z našich výsledků vyplývá že mitochondriální dysfunkce u tohoto modelu AD není omezena jen na CNS, zejména hipokampus, ale že se vyvíjí i v periferních tkáních a buňkách.

Asi nejzajímavější nález byl identifikován v kosterním svalu potkanů TgF344-AD, kde byla snížena mitochondriální fosforylační a elektrontransportní kapacita systému už ve věku 6 měsíců, a to u samců i samic. Sarkopenie i mitochondriální dysfunkce předcházející kognitivnímu deficitu byly popsány u několika myších transgenních modelů AD [Monteiro-Cardoso et al., 2015; Brisendine et al., 2023]. Velkou pozornost přitahuje vztah fyzické aktivity a kognitivních funkcí u lidí. Jak je již naznačeno výše (viz Diskuse k cíli 1), pravidelná fyzická aktivita je považována za faktor chránící před nástupem poruchy kognice. Vidyanti a kol. [2025] dokonce uvádí, že bychom mohli fyzickou aktivitu považovat také za léčebnou strategii, která by mohla bránit progresi kognitivní dysfunkce u různých etiopatogenetických typů syndromu demence. Náš transgenní model potkana se jeví jako velmi vhodný pro testování takových strategií. Časování, typ a velikost zátěže a její pravidelnost mohou přinést nový vhled do poznání vztahu mitochondriální dysfunkce kosterního svalu a kognitivní zdatnosti.

Také v trombocytech 6měsíčních transgenních potkanů jsme zjistili snížené parametry mitochondriální respirace, i když statistické významnosti dosáhl tento pokles jen u samic. Ve věku 12 měsíců měli samci nižší bazální respiraci. Mitochondriální elektrontransportní kapacita trombocytů však nijak nekorelovala s obdobným parametrem jakékoliv jiné testované tkáně, takže využití mitochondriální analýzy trombocytů jako markeru všeobecné mitochondriální zdatnosti se jeví jako problematické, minimálně u tohoto živočišného druhu.

Další analyzovanou tkání byla kůra ledvin, kde ve věku 12 měsíců byla zaznamenána signifikantně nižší celková fosforylační kapacita u transgenních samců i samic ve srovnání se stejně starými kontrolami. Je známo, že celá řada renálních onemocnění je spojena s mitochondriální dysfunkcí, která je považována za významný patogenetický faktor přispívající k progresi vlastního onemocnění [Wang et al., 2024]. V posledních letech je také zkoumána asociace mezi renální dysfunkcí a rizikem a rozvojem demence [Zhang et al., 2020]. Ledviny se významně podílejí na odstraňování amyloidových peptidů z cirkulace, takže redukují akumulaci těchto látek v mozku [Liu et al., 2015]. Bylo prokázáno, že pacienti s chronickým onemocněním ledvin mají větší riziko demence [Deckers et al., 2017; Zhao et al., 2024]. Ohledně role ledvin v rozvoji kognitivní dysfunkce však nepanuje shoda a některé studie tento vztah zpochybňují [Stocker et al., 2023]. Naše výsledky však dokumentují možný vliv AD na rozvoj renální dysfunkce, což je aspekt, který dosud nebyl podrobněji zkoumán.

V játrech transgenních potkanů jsme zaznamenali zcela odlišný vývoj mitochondriálních respiračních parametrů než v jiných orgánech: v 6 měsících věku se výsledky nijak nelišily mezi transgenními a kontrolními vzorky, ve 12 měsících jsme zaznamenali statisticky významný vzestup respirace u potkanů TgF344-AD, který se výrazněji projevil u samců. U 24měsíčních transgenních potkanů byla mitochondriální aktivita naopak signifikantně nižší u samců i samic ve srovnání s odpovídajícími kontrolami.

Játra jsou významným orgánem eliminace amyloidových peptidů z cirkulace. Uvádí se, že dokonce až 90 % cirkulujících peptidů Aβ je odstraňováno játry [Ghiso et al., 2004]. Hepatocyty vychytávají peptidy receptorově zprostředkovanou endocytózou prostřednictvím receptoru LRP1 (z anglického low-density lipoprotein receptor-related protein 1), jehož exprese se s věkem snižuje [Tamaki et al., 2006]. Bylo také prokázáno, že jaterní dysfunkce a zhoršená eliminace amyloidových peptidů játry vede k jejich zvýšené akumulaci v mozku a kognitivním poruchám [Cheng et al., 2023; Wang et al., 2017b]. Je tedy možné, že v době plného rozvoje AD (ve 12 měsících) dochází k maximální stimulaci energeticky náročného uptaku

peptidů Aβ jaterními buňkami a s rostoucím věkem eliminace peptidů klesá díky snížené jaterní funkci.

Výsledky analýzy mitochondriální respirace myokardu levé i pravé komory transgenních zvířat ukázaly významné mezipohlavní rozdíly. U samců došlo k signifikantnímu poklesu mitochondriální spotřeby kyslíku ve věku 12 měsíců, u samic zůstaly hodnoty srovnatelné s kontrolami ve všech sledovaných věkových obdobích.

Oboustranný vztah mezi kardiovaskulárním onemocněním a kognitivní zdatností byl popsán v preklinických i klinických studiích. Chronická srdeční nedostatečnost, zejména snížený srdeční index, je spojena s horší kognitivní výkonností a zvýšeným rizikem AD [Jefferson et al., 2015]. U pacientů s AD byly prokázány depozity amyloidových peptidů v myokardu, které zvyšovaly nepoddajnost srdeční svaloviny [Jin et al., 2017; Troncone et al., 2016]. Systolická dysfunkce společně s cerebrální amyloidní angiopatií, jednou z patologicko-anatomických známek AD, způsobují horší perfuzi mozku a následně zhoršenou clearance amyloidových peptidů, což může akcelerovat průběh demence [Bu et al., 2018; Jin et al., 2017; Xiang et al., 2015]. U myšího modelu AD bylo prokázáno komplexní postižení srdce zahrnující diastolickou dysfunkci způsobenou zejména akumulací agregátů Aβ peptidů a rozsáhlou poruchu mitochondriálních funkcí [Aishwarya et al., 2024].

Menší postižení mitochondriálních funkcí myokardu samic v našich experimentech se může vztahovat k pohlavním rozdílům zaznamenaným v souvislosti se stárnutím u kontrolních potkanů kmene F344 [Jedlička et al., 2022] a transgenních zvířat TgF344-AD [Puris et al., 2022; Chaudry et al., 2022]. U kontrolních samic dochází mezi 6. a 12. měsícem věku k výraznějšímu poklesu mitochondriálních respiračních parametrů než u samců. Je tedy možné, že v tomto věku už se vliv genotypu AD výrazně neprojeví, stejně jako u samců ve věku 24 měsíců [Jedlička et al., 2022]. U transgenních potkanů bylo zjištěno, že u samců dochází ke zvýšené expresi transportéru ABCC1 (z anglického ATP-binding cassette subfamily C member 1), který může být zodpovědný za vyšší přestup amyloidových peptidů z mozku do krve [Puris et al., 2022], u samic byla zaznamenána vyšší exprese podjednotky GluA2 glutamátového receptoru v hipokampu a lepší výkonnost prostorové paměti než u samců navzdory vyšší akumulaci amyloidových agregátů v hipokampu [Chaudry et al., 2022].

Časnější postižení mitochondriální respirace u samců jsme zaznamenali i v hipokampu, kde ve 12 měsících byly mitochondriální parametry signifikantně

snížené, ale u samic se od kontrolních vzorků nelišily, i když vykazovaly trend k poklesu. Ve věku 24 měsíců už byla mitochondriální dysfunkce patrná i u transgenních samic. V dalším výzkumu bude třeba analyzovat, do jaké míry se klesající mitochondriální aktivita tkáně vztahuje k mitochondriím samotným a do jaké míry k prokázanému úbytku neuronů v hipokampu, který se manifestuje dříve u samců než u samic [Chaudry et al., 2022]. Podobně v mozečku se mitochondriální dysfunkce projevila ve věku 12 měsíců u transgenních samců, ale ve 24 měsících se dále neprohloubila, což může souviset s výrazným poklesem mitochondriální respirační aktivity mozečkové tkáně s věkem [Jedlička et al., 2022]. U nejstarších zvířat je spontánní motorická aktivita minimální [Ingram, 2000]. To se může odrazit také v klesající potřebě mitochondriální respirace a syntézy ATP v mozečku. Vztahu mezi svalovou aktivitou a funkcí cerebella nasvědčuje i signifikantní korelace mezi mitochondriální kapacitou elektrontransportního systému v obou tkáních u zdravých potkanů (tabulka 12).

2.6 Závěry a perspektivy

Syndrom demence je jedním z hlavních a devastujících zdravotních problémů stárnoucí populace. Běžně mu předchází tzv. mírná kognitivní porucha. Etiopatogeneze nejčastějších příčin, mezi kterými dominuje AD, není dosud dostatečně objasněna. Známe některé rizikové faktory, z nichž nejvýznamnějším je pokročilý věk. Za důležitý protektivní element se považuje fyzická zdatnost a aktivita. Nicméně i v našem nadstandardně aktivním souboru seniorů jsme prokázali vysokou prevalenci suspektního kognitivního postižení dle senzitivního screeningového testu MoCA. Naši první hypotézu, že v populaci zdatných a nezávislých seniorů nad 70 let je relativně nízká prevalence (do 20 %) klinicky měřitelné kognitivní dysfunkce, jsme tedy nepotvrdili. Jako hlavní z důvodů se primárně nabízí charakter kognitivních poruch, tj. jejich velmi pozvolný a plíživý průběh, který může po dlouhou dobu unikat pozornosti okolí i samotného pacienta. Zároveň v naší práci připouštíme zkreslení dané relativně přísným nastavením kognitivního testování, kdy jsme preferovali senzitivitu nad specificitou, abychom zajistili kvalitní a kognitivně-intaktní kontrolní soubor pro další cíle práce.

Kognitivní screening seniorů je v ČR krátce dostupný a probíhá v režii praktických lékařů. Z naší práce nepřímo vyplývá jeho opodstatněnost z hlediska prevalence suspektní kognitivní poruchy i v aktivní seniorské populaci, nicméně je nutné brát zřetel také na negativní důsledky testování, které mohou být spojeny s falešně pozitivními výsledky. Výtěžnost probíhajícího screeningu je z našeho pohledu vhodné v pravidelných intervalech systematicky vyhodnocovat.

Druhou hypotézu práce, tedy že mitochondriální respirace trombocytů s rostoucím věkem klesá, jsme potvrdili, a to na základě dvou analytických metod, které se ve výzkumu buněčné bioenergetiky nejčastěji používají, tedy vysoce účinné respirometrie O2k a metabolické analýzy Seahorse. Oxidativní produkce ATP s věkem klesá a tento deficit není nahrazen z jiných zdrojů (glykolýzou), což může mít v konečném důsledku vliv na funkční zdatnost trombocytů ve vyšším věku. V dalším výzkumu vztahu mezi fyziologickým stárnutím a mitochondriální funkcí krevních destiček je třeba se zaměřit na vliv fyzické aktivity, diety a dalších snadno ovlivnitelných faktorů životního stylu na celkovou funkci trombocytů. Domníváme se také, že podrobnější znalost mitochondriálních respiračních parametrů buněk periferní krve skutečně zdravých seniorů je potřebná pro zjišťování vlivu dalších onemocnění souvisejících s vyšším věkem (tj. nejen demencí) na mitochondriální a další funkční parametry trombocytů. Opět tím potvrzujeme nutnost výběru

odpovídajícího kontrolního souboru, i když je nesmírně pracný a vhodných dobrovolníků je velmi málo.

Třetí hypotézu, tj. že demence jakéhokoliv původu má negativní vliv na mitochondriální respiraci trombocytů, jsme potvrdili pouze částečně. Nejslibněji se jeví stanovení aktivity komplexu IV (CIV), která byla statisticky významně snížena u pacientů s demencí. Přes tento nález, který je v souladu s dalšími vědeckými pracemi, je význam měření mitochondriální dysfunkce v klinické praxi velmi sporný. Z našeho pohledu je výzkum mitochondriální respirace u syndromu demence a jeho nejčastější příčiny (AD) náročný z hlediska eliminace faktorů, které mohou výsledky zkreslit, a to jak u samotných pacientů s demencí, tak u kontrolního souboru podobného věku. Nekonzistentní výsledky a náročnost metod se zdají být zásadní překážkou ve využití měření funkce mitochondrií jako potenciálního biomarkeru syndromu demence, zejména AD. Explorace dysfunkce mitochondriálního elektrontransportního systému v trombocytech tedy pravděpodobně nepovede ke zjednodušení diagnostiky AD, ale může být podstatná z hlediska pochopení patofyziologických procesů AD.

Experimenty na transgenních potkanech poukázaly na významné postižení mitochondriálních funkcí periferních tkání a buněk v souvislosti s AD. Potvrdili jsme tak naši hypotézu, že Alzheimerova choroba je doprovázena dysfunkcí mitochondrií nejen v CNS, ale i v periferních orgánech a trombocytech, minimálně u genetického modelu TgF344-AD. U námi zvoleného modelu se nejvhodnějším věkem pro studium mitochondriální dysfunkce při plném rozvoji onemocnění jeví 12 měsíců, studium prodromálního stadia je třeba posunout do ještě mladších věkových kategorií než je 6 měsíců. Kromě mitochondriální aktivity je třeba přesně analyzovat expresi lidského APP ve zkoumaných tkáních, případně akumulaci agregátů amyloidových peptidů, zejména v kosterním svalu, myokardu, ledvinách a játrech. Výsledky našich experimentů také potvrzují možný obousměrný vztah mezi tvorbou patogenních peptidů v mozku a schopností jejich odstraňování směrem do periferní cirkulace s následným poškozením periferních orgánů. Dysfunkce orgánů způsobená ukládáním peptidů nebo zhoršením jejich exkreční funkce naopak může zhoršovat rovnováhu mezi tvorbou a odstraňováním peptidů Aβ v mozku.

I přes často zmiňovaný nízký translační potenciál výsledků experimentů na malých laboratorních hlodavcích je třeba zmínit několik primárních výsledků našeho výzkumu. Dosud často zmiňovaná asociace mezi mitochondriální respirací buněk periferní krve a jinými orgány u lidí se vztahovala výhradně ke kosternímu svalu na malém počtu zkoumaných jedinců. Naše studie je první, která se zabývala

komplexní analýzou mitochondriální respirace v několika orgánech a současně v trombocytech a nenalezla žádný obecný vzorec celkové mitochondriální zdatnosti, která by se zrcadlila právě v krevních destičkách. Za další významný výsledek považujeme nález rozsáhlejší mitochondriální dysfunkce periferních orgánů potkana s modelem AD, a to dokonce i v časných stádiích onemocnění. V této souvislosti je zajímavé zmínit, že na možnost systémového charakteru onemocnění AD je poukazováno delší dobu na základě studií prokazujících vyšší riziko vzniku a progrese AD u pacientů s onemocněním jater, ledvin nebo srdce. Model transgenního potkana TgF344-AD, případně jiné vhodné finančně akceptovatelné modely tohoto onemocnění, umožní tyto nové souvislosti dále hlouběji studovat.

3 Literatura

1. AISEN, Paul S.; CUMMINGS, Jeffrey; JACK, Clifford R.; MORRIS, John C.; SPERLING, Reisa et al., 2017. On the path to 2025: understanding the Alzheimer's disease continuum. *Alzheimer's Research & Therapy*. Vol. 9, no. 1. ISSN 1758-9193. Dostupné z: https://doi.org/10.1186/s13195-017-0283-5.

2. AISHWARYA, Richa; ABDULLAH, Chowdhury S.; REMEX, Naznin Sultana; BHUIYAN, Mohammad Alfrad Nobel; LU, Xiao-Hong et al., 2024. Diastolic dysfunction in Alzheimer's disease model mice is associated with Aβ-amyloid aggregate formation and mitochondrial dysfunction. *Scientific Reports*. Vol. 14, no. 1, s. 16715. ISSN 2045-2322. Dostupné z: https://doi.org/10.1038/s41598-024-67638-x.

3. AIZENSTEIN, Howard Jay; NEBES, Robert D.; SAXTON, Judith A.; PRICE, Julie C.; MATHIS, Chester A. et al., 2008. Frequent Amyloid Deposition Without Significant Cognitive Impairment Among the Elderly. *Archives of Neurology*. Vol. 65, no. 11, s. 1509-1517. ISSN 0003-9942. Dostupné z: https://doi.org/10.1001/archneur.65.11.1509.

4. AKHTAR, Ansab; GUPTA, Shraddha M.; DWIVEDI, Shubham; KUMAR, Devendra; SHAIKH, Mohd. Farooq et al., 2022. Preclinical Models for Alzheimer's Disease: Past, Present, and Future Approaches. *ACS Omega*. Vol. 7, no. 51, s. 47504-47517. ISSN 2470-1343. Dostupné z: https://doi.org/10.1021/acsomega.2c05609.

5. AKKERMAN, J. W. a HOLMSEN, H., 1981. Interrelationships among platelet responses: studies on the burst in proton liberation, lactate production, and oxygen uptake during platelet aggregation and Ca2+ secretion. *Blood*. Vol. 57, no. 5, s. 956–966. ISSN 1528-0020.

6. ALAVI, Abass; DANN, Robert; CHAWLUK, John; ALAVI, Jane; KUSHNER, Michael et al., 1986. Positron emission tomography imaging of regional cerebral glucose metabolism. *Seminars in Nuclear Medicine*. Vol. 16, no. 1, s. 2-34. ISSN 00012998. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/S0001-2998(86)80002-2.

7. ALBERTS, Bruce, 1998. *Základy buněčné biologie: úvod do molekulární biologie buňky*. 2. vyd. Ústí nad Labem: Espero Publishing. ISBN 80-902906-2-0.

8. ALLEMAND, Mathias; ZIMPRICH, Daniel a HERTZOG, Christopher, 2007. Cross‐Sectional Age Differences and Longitudinal Age Changes of Personality in Middle Adulthood and Old Age. *Journal of Personality*. Vol. 75, no. 2, s. 323-358. ISSN 0022-3506. Dostupné z: https://doi.org/10.1111/j.1467-6494.2006.00441.x.

9. ALZHEIMER EUROPE, 2019. *Dementia in Europe Yearbook 2019: Estimating the prevalence of dementia in Europe*. ISBN 978-99959-995-9-9. Dostupné z: chrome-extension://oemmndcbldboiebfnladdacbdfmadadm/https://www.alzheimer-europe.org/sites/default/files/alzheimer_europe_dementia_in_europe_yearbook_2019.pdf. [cit. 2025-03-01].

10. ALZHEIMER'S ASSOCIATION, 2020. 2020 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & Dementia*. Vol. 16, no. 3, s. 391-460. ISSN 1552-5260. Dostupné z: https://doi.org/10.1002/alz.12068.

11. ANDERTON, Brian H., 1997. Changes in the ageing brain in health and disease. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*. Vol. 352, no. 1363, s. 1781-1792. ISSN 0962-8436. Dostupné z: https://doi.org/10.1098/rstb.1997.0162.

12. ANTHONY, James C.; LERESCHE, Linda; NIAZ, Unaiza; VON KORFF, Michael R. a FOLSTEIN, Marshal F., 1982. Limits of the 'Mini-Mental State' as a screening test for dementia and delirium among hospital patients. *Psychological Medicine*. Vol. 12, no. 2, s. 397-408. ISSN 0033-2917. Dostupné z: https://doi.org/10.1017/S0033291700046730.

13. ARDILES, Álvaro O.; TAPIA-ROJAS, Cheril C.; MANDAL, Madhuchhanda; ALEXANDRE, Frédéric; KIRKWOOD, Alfredo et al., 2012. Postsynaptic dysfunction is associated with spatial and object recognition memory loss in a natural model of Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. Vol. 109, no. 34, s. 13835-13840. ISSN 0027-8424. Dostupné z: https://doi.org/10.1073/pnas.1201209109.

14. AVILA, C.; HUANG, R.; STEVENS, M.; APONTE, A.; TRIPODI, D. et al., 2012. Platelet Mitochondrial Dysfunction is Evident in Type 2 Diabetes in Association with Modifications of Mitochondrial Anti-Oxidant Stress Proteins. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*. Vol. 120, no.

04, s. 248-251. ISSN 0947-7349. Dostupné z: https://doi.org/10.1055/s-0031-1285833.

15. BAJRACHARYA, Rijan; YOUNGSON, Neil A. a BALLARD, J. William O., 2019. Dietary Macronutrient Management to Treat Mitochondrial Dysfunction in Parkinson's Disease. *International Journal of Molecular Sciences*. Vol. 20, no. 8, s. 1850. ISSN 1422-0067. Dostupné z: https://doi.org/10.3390/ijms20081850.

16. BARTOŠ, Aleš; ORLÍKOVÁ, Hana; RAISOVÁ, Miloslava a ŘÍPOVÁ, Dagmar, 2014. Česká tréninková verze Montrealského kognitivního testu (MoCA-CZ1) k časné detekci Alzheimerovy nemoci. *Česká a slovenská neurologie a neurochirurgie*. Roč. 77/110, č. 5, s. 587–595. ISSN 1803-6597.

17. BARTOS, Ales a RAISOVA, Miloslava, 2016. The Mini-Mental State Examination: Czech Norms and Cutoffs for Mild Dementia and Mild Cognitive Impairment due to Alzheimer's Disease. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders*. Vol. 42, no. 1-2, s. 50-57. ISSN 1420-8008. Dostupné z: https://doi.org/10.1159/000446426.

18. BECKER, G. A.; CHALOS, M. K.; TUCCELLI, M. a ASTER, R. H., 1972. Prostaglandin E 1 in Preparation and Storage of Platelet Concentrates. *Science*. Vol. 175, no. 4021, s. 538-539. ISSN 0036-8075. Dostupné z: https://doi.org/10.1126/science.175.4021.538.

19. BELL, Robert D. a ZLOKOVIC, Berislav V., 2009. Neurovascular mechanisms and blood–brain barrier disorder in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathologica*. Vol. 118, no. 1, s. 103-113. ISSN 0001-6322. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/s00401-009-0522-3.

20. BENDA, Carl, 1898. Ueber die Spermatogenese der Vertebraten und höherer Evertebraten, II. Theil: Die Histiogenese der Spermien. *Archiv für Physiologie*. Vol. 73, s. 393–398. Dostupné také z: https://www.biodiversitylibrary.org/item/109725#page/11/mode/1up.

21. BERKOVÁ, Marie; TOPINKOVÁ, Eva; MÁDLOVÁ, Pavla; KLÁN, Jan; VLACHOVÁ, Martina et al., 2013. "Krátká baterie pro testování fyzické zdatnosti seniorů" - Pilotní studie a validizace testu u starších osob v České republice. *Vnitřní lékařství*. Roč. 59, č. 4, s. 256-263.

22. BERNAUD, Victoria E.; BULEN, Haidyn L.; PEÑA, Veronica L.; KOEBELE, Stephanie V.; NORTHUP-SMITH, Steven N. et al., 2022. Task-dependent learning and memory deficits in the TgF344-AD rat model of Alzheimer's disease: three key timepoints through middle-age in females. *Scientific Reports*. Vol. 12, no. 1, s. 14596. ISSN 2045-2322. Dostupné z: https://doi.org/10.1038/s41598-022-18415-1.

23. BEȚIU, Alina M.; NOVEANU, Lavinia; HÂNCU, Iasmina M.; LASCU, Ana; PETRESCU, Lucian et al., 2022. Mitochondrial Effects of Common Cardiovascular Medications: The Good, the Bad and the Mixed. *International Journal of Molecular Sciences*. Vol. 23, no. 21, s. 13653. ISSN 1422-0067. Dostupné z: https://doi.org/10.3390/ijms232113653.

24. BEZAWORK-GELETA, Ayenachew; ROHLENA, Jakub; DONG, Lanfeng; PACAK, Karel a NEUZIL, Jiri, 2017. Mitochondrial Complex II: At the Crossroads. *Trends in Biochemical Sciences*. Vol. 42, no. 4, s. 312-325. ISSN 09680004. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.tibs.2017.01.003.

25. BIESSELS, Geert Jan, 2016. Diagnosis and treatment of vascular damage in dementia. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. Vol. 1862, no. 5, s. 869-877. ISSN 09254439. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2015.11.009.

26. BISHAY, J.; BECKETT, T. L.; LAI, A. Y.; HILL, M. E.; MCMAHON, D. et al., 2022. Venular amyloid accumulation in transgenic Fischer 344 Alzheimer's disease rats. *Scientific Reports*. Vol. 12, no. 1, s. 15287. ISSN 2045-2322. Dostupné z: https://doi.org/10.1038/s41598-022-19549-y.

27. BIUNDO, Roberta; WEIS, L.; BOSTANTJOPOULOU, S.; STEFANOVA, E.; FALUP-PECURARIU, C. et al., 2016. MMSE and MoCA in Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies: a multicenter 1-year follow-up study. *Journal of Neural Transmission*. Vol. 123, no. 4, s. 431-438. ISSN 0300-9564. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/s00702-016-1517-6.

28. BOENGLER, Kerstin; KOSIOL, Maik; MAYR, Manuel; SCHULZ, Rainer a ROHRBACH, Susanne, 2017. Mitochondria and ageing: role in heart, skeletal muscle and adipose tissue. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*. Vol. 8, no. 3, s. 349-369. ISSN 2190-5991. Dostupné z: https://doi.org/10.1002/jcsm.12178.

29. BOFFOLI, D.; SCACCO, S.C.; VERGARI, R.; SOLARINO, G.; SANTACROCE, G. et al., 1994. Decline with age of the respiratory chain activity in human skeletal muscle. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. Vol. 1226, no. 1, s. 73-82. ISSN 09254439. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/0925-4439(94)90061-2.

30. BRAAK, Eva; GRIFFING, Katherine; ARAI, Kimihito; BOHL, Jürgen; BRATZKE, Hansjürgen et al., 1999. Neuropathology of Alzheimer's disease: what is new since A. Alzheimer? *European Archives of Psychiatry and Clinical Neurosciences*. Vol. 249, no. Suppl. 3, s. 14-22. ISSN 0940-1334. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/PL00014168.

31. BRADFORD, Andrea; KUNIK, Mark E.; SCHULZ, Paul; WILLIAMS, Susan P. a SINGH, Hardeep, 2009. Missed and Delayed Diagnosis of Dementia in Primary Care. *Alzheimer Disease & Associated Disorders*. Vol. 23, no. 4, s. 306-314. ISSN 0893-0341. Dostupné z: https://doi.org/10.1097/WAD.0b013e3181a6bebc.

32. BRAGANZA, Andrea; COREY, Catherine G.; SANTANASTO, Adam J.; DISTEFANO, Giovanna; COEN, Paul M. et al., 2019. Platelet bioenergetics correlate with muscle energetics and are altered in older adults. *JCI Insight*. Vol. 5, no. 13, s. e128248. ISSN 2379-3708. Dostupné z: https://doi.org/10.1172/jci.insight.128248.

33. BRAIDY, Nady; POLJAK, Anne; JAYASENA, Tharusha; MANSOUR, Hussein; INESTROSA, Nibaldo C. et al., 2015. Accelerating Alzheimer's research through 'natural' animal models. *Current Opinion in Psychiatry*. Vol. 28, no. 2, s. 155-164. ISSN 0951-7367. Dostupné z: https://doi.org/10.1097/YCO.0000000000000137.

34. BRISCHIGLIARO, Michele a ZEVIANI, Massimo, 2021. Cytochrome c oxidase deficiency. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. Vol. 1862, no. 1, s. 148335. ISSN 00052728. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.bbabio.2020.148335.

35. BRISENDINE, Matthew H; NICHENKO, Anna S; BANDARA, Aloka B; WILLOUGHBY, Orion S; AMIRI, Niloufar et al., 2024. Neuromuscular Dysfunction Precedes Cognitive Impairment in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Function*. Vol. 5, no. 1, s. zqad066. ISSN 2633-8823. Dostupné z: https://doi.org/10.1093/function/zqad066.

36. BURWINKEL, Michael; LUTZENBERGER, Manuel; HEPPNER, Frank L.; SCHULZ-SCHAEFFER, Walter a BAIER, Michael, 2018. Intravenous injection of beta-amyloid seeds promotes cerebral amyloid angiopathy (CAA). *Acta Neuropathologica Communications*. Vol. 6, no. 1, s. 23. ISSN 2051-5960. Dostupné z: https://doi.org/10.1186/s40478-018-0511-7.

37. BUSH, A. I.; MARTINS, R. N.; RUMBLE, B.; MOIR, R.; FULLER, S. et al., 1990. The amyloid precursor protein of Alzheimer's disease is released by human platelets. *The Journal of biological chemistry*. Vol. 265, no. 26, s. 15977–15983. ISSN 0021-9258.

38. BUSIELLO, Rosa A.; SAVARESE, Sabrina a LOMBARDI, Assunta, 2015. Mitochondrial uncoupling proteins and energy metabolism. *Frontiers in Physiology*. Vol. 6, s. 36. ISSN 1664-042X. Dostupné z: https://doi.org/10.3389/fphys.2015.00036.

39. BU, X.-L.; XIANG, Y.; JIN, W.-S.; WANG, J.; SHEN, L.-L. et al., 2018. Blood-derived amyloid-β protein induces Alzheimer's disease pathologies. *Molecular Psychiatry*. Vol. 23, no. 9, s. 1948-1956. ISSN 1359-4184. Dostupné z: https://doi.org/10.1038/mp.2017.204.

40. CALKINS, Marcus J. a REDDY, P. Hemachandra, 2011. Assessment of newly synthesized mitochondrial DNA using BrdU labeling in primary neurons from Alzheimer's disease mice: Implications for impaired mitochondrial biogenesis and synaptic damage. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. Vol. 1812, no. 9, s. 1182-1189. ISSN 09254439. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2011.04.006.

41. CANEVELLI, Marco; GRANDE, Giulia; LACORTE, Eleonora; QUARCHIONI, Elisa; CESARI, Matteo et al., 2016. Spontaneous Reversion of Mild Cognitive Impairment to Normal Cognition: A Systematic Review of Literature and Meta-Analysis. *Journal of the American Medical Directors Association*. Vol. 17, no. 10, s. 943-948. ISSN 15258610. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.jamda.2016.06.020.

42. CARSON, Nicole; LEACH, Larry a MURPHY, Kelly J., 2018. A re‐examination of Montreal Cognitive Assessment (MoCA) cutoff scores. *International Journal of Geriatric Psychiatry*. Vol. 33, no. 2, s. 379-388. ISSN 0885-6230. Dostupné z: https://doi.org/10.1002/gps.4756.

43. CHACKO, Balu K; KRAMER, Philip A; RAVI, Saranya; JOHNSON, Michelle S; HARDY, Robert W et al., 2013. Methods for defining distinct bioenergetic profiles in platelets, lymphocytes, monocytes, and neutrophils, and the oxidative burst from human blood. *Laboratory Investigation*. Vol. 93, no. 6, s. 690-700. ISSN 00236837. Dostupné z: https://doi.org/10.1038/labinvest.2013.53.

44. CHANCE, B. a WILLIAMS, G. R., 1955a. Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. III. The steady state. *The Journal of biological chemistry*. Vol. 217, no. 1, s. 409-427. ISSN 0021-9258.

45. CHANCE, B. a WILLIAMS, G. R., 1955b. Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. IV. The respiratory chain. *The Journal of biological chemistry*. Vol. 217, no. 1, s. 429-438. ISSN 0021-9258.

46. CHAUDRY, Osama; NDUKWE, Kelechi; XIE, Lei; FIGUEIREDO-PEREIRA, Maria; SERRANO, Peter et al., 2022. Females exhibit higher GluA2 levels and outperform males in active place avoidance despite increased amyloid plaques in TgF344-Alzheimer's rats. *Scientific Reports*. Vol. 12, no. 1, s. 19129. ISSN 2045-2322. Dostupné z: https://doi.org/10.1038/s41598-022-23801-w.

47. CHENG, Yuan; HE, Chen-Yang; TIAN, Ding-Yuan; CHEN, Si-Han; REN, Jun-Rong et al., 2023. Physiological β-amyloid clearance by the liver and its therapeutic potential for Alzheimer's disease. *Acta Neuropathologica*. Vol. 145, no. 6, s. 717-731. ISSN 0001-6322. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/s00401-023-02559-z.

48. CHENG, Yuan; TIAN, Ding-Yuan a WANG, Yan-Jiang, 2020. Peripheral clearance of brain-derived Aβ in Alzheimer's disease: pathophysiology and therapeutic perspectives. *Translational Neurodegeneration*. Vol. 9, no. 1, s. 16. ISSN 2047-9158. Dostupné z: https://doi.org/10.1186/s40035-020-00195-1.

49. CHEN, Yong-xin; YANG, Hong; WANG, Da-song; CHEN, Ting-ting; QI, Xiao-lan et al., 2024. Gastrodin alleviates mitochondrial dysfunction by regulating SIRT3-mediated TFAM acetylation in vascular dementia. *Phytomedicine*. Vol. 128, s. 155369. ISSN 09447113. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.phymed.2024.155369.

50. CHOKSI, Kashyap B.; NUSS, Jonathan E.; DEFORD, James H. a PAPACONSTANTINOU, John, 2011. Mitochondrial electron transport chain functions in long-lived Ames dwarf mice. *Aging*. Vol. 3, no. 8, s. 754-767. ISSN 1945-4589. Dostupné z: https://doi.org/10.18632/aging.100357.

51. CHOW, Tiffany W.; BINNS, Malcolm A.; FREEDMAN, Morris; STUSS, Donald T.; RAMIREZ, Joel et al., 2008. Overlap in Frontotemporal Atrophy Between Normal Aging and Patients With Frontotemporal Dementias. *Alzheimer Disease & Associated Disorders*. Vol. 22, no. 4, s. 327-335. ISSN 0893-0341. Dostupné z: https://doi.org/10.1097/WAD.0b013e31818026c4.

52. CIESIELSKA, Natalia; SOKOŁOWSKI, Remigiusz; MAZUR, Ewelina; PODHORECKA, Marta; POLAK-SZABELA, Anna et al., 2016. Is the Montreal Cognitive Assessment (MoCA) test better suited than the Mini-Mental State Examination (MMSE) in mild cognitive impairment (MCI) detection among people aged over 60? Meta-analysis. *Psychiatria Polska*. Vol. 50, no. 5, s. 1039-1052. ISSN 0033-2674. Dostupné z: https://doi.org/10.12740/PP/45368.

53. COHEN, Robert M.; REZAI-ZADEH, Kavon; WEITZ, Tara M.; RENTSENDORJ, Altan; GATE, David et al., 2013. A Transgenic Alzheimer Rat with Plaques, Tau Pathology, Behavioral Impairment, Oligomeric Aβ, and Frank Neuronal Loss. *The Journal of Neuroscience*. Vol. 33, no. 15, s. 6245-6256. ISSN 0270-6474. Dostupné z: https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3672-12.2013.

54. COLEMAN, Kristy K.L.; COLEMAN, Brenda L.; MACKINLEY, Julia D.; PASTERNAK, Stephen H. a FINGER, Elizabeth C., 2016. Detection and Differentiation of Frontotemporal Dementia and Related Disorders From Alzheimer Disease Using the Montreal Cognitive Assessment. *Alzheimer Disease & Associated Disorders*. Vol. 30, no. 3, s. 258-263. ISSN 0893-0341. Dostupné z: https://doi.org/10.1097/WAD.0000000000000119.

55. COOPER, J.M.; MANN, V.M. a SCHAPIRA, A.H.V., 1992. Analyses of mitochondrial respiratory chain function and mitochondrial DNA deletion in human skeletal muscle: Effect of ageing. *Journal of the Neurological Sciences*. Vol. 113, no. 1, s. 91-98. ISSN 0022510X. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/0022-510X(92)90270-U.

56. CROFTS, Antony R., 2004. The Cytochrome bc 1 Complex: Function in the Context of Structure. *Annual Review of Physiology*. Vol. 66, no. 1, s.

689-733. ISSN 0066-4278. Dostupné z: https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.66.032102.150251.

57. CUMMINGS, Jeffrey; LEE, Garam; RITTER, Aaron; SABBAGH, Marwan a ZHONG, Kate, 2019. Alzheimer's disease drug development pipeline: 2019. *Alzheimer's & Dementia: Translational Research & Clinical Interventions*. Vol. 5, s. 272-293. ISSN 2352-8737. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.trci.2019.05.008.

58. DECKERS, Kay; CAMERINO, Ileana; VAN BOXTEL, Martin P.J.; VERHEY, Frans R.J.; IRVING, Kate et al., 2017. Dementia risk in renal dysfunction. *Neurology*. Vol. 88, no. 2, s. 198-208. ISSN 0028-3878. Dostupné z: https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000003482.

59. DEN BRAVE, Fabian; SCHULTE, Uwe; FAKLER, Bernd; PFANNER, Nikolaus a BECKER, Thomas, 2024. Mitochondrial complexome and import network. *Trends in Cell Biology*. Vol. 34, no. 7, s. 578-594. ISSN 09628924. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.tcb.2023.10.004.

60. DONNER, Lili; FEIGE, Tobias; FREIBURG, Carolin; TOSKA, Laura Mara; REICHERT, Andreas S. et al., 2021. Impact of Amyloid-β on Platelet Mitochondrial Function and Platelet–Mediated Amyloid Aggregation in Alzheimer's Disease. *International Journal of Molecular Sciences*. Vol. 22, no. 17, s. 9633. ISSN 1422-0067. Dostupné z: https://doi.org/10.3390/ijms22179633.

61. DRAXL, A.; EIGENTLER, A. a GNAIGER, E., 2015. PBI-Shredder HRR-Set: preparation of tissue homogenates for diagnosis of mitochondrial respiratory function. Online. *Mitochondrial Physiology Network*. Vol. 17, no. 2, s. 1-9. Dostupné z: chrome-extension://oemmndcbldboiebfnladdacbdfmadadm/https://www.biobl ast.at/images/c/c7/MiPNet17.02_PBI-Shredder_HRR-Set.pdf. [cit. 2025-03-29].

62. DRUMMOND, Eleanor a WISNIEWSKI, Thomas, 2017. Alzheimer's disease: experimental models and reality. *Acta Neuropathologica*. Vol. 133, no. 2, s. 155-175. ISSN 0001-6322. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/s00401-016-1662-x.

63. DUBOIS, Bruno; VILLAIN, Nicolas; FRISONI, Giovanni B; RABINOVICI, Gil D; SABBAGH, Marwan et al., 2021. Clinical diagnosis

of Alzheimer's disease: recommendations of the International Working Group. *The Lancet Neurology*. Vol. 20, no. 6, s. 484-496. ISSN 14744422. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/S1474-4422(21)00066-1.

64. ESPARZA, Thomas J.; ZHAO, Hanzhi; CIRRITO, John R.; CAIRNS, Nigel J.; BATEMAN, Randall J. et al., 2013. Amyloid‐beta oligomerization in Alzheimer dementia versus high‐pathology controls. *Annals of Neurology*. Vol. 73, no. 1, s. 104-119. ISSN 0364-5134. Dostupné z: https://doi.org/10.1002/ana.23748.

65. FANG, Evandro F.; HOU, Yujun; PALIKARAS, Konstantinos; ADRIAANSE, Bryan A.; KERR, Jesse S. et al., 2019. Mitophagy inhibits amyloid-β and tau pathology and reverses cognitive deficits in models of Alzheimer's disease. *Nature Neuroscience*. Vol. 22, no. 3, s. 401-412. ISSN 1097-6256. Dostupné z: https://doi.org/10.1038/s41593-018-0332-9.

66. FANG, Xing; BORDER, Jane J.; RIVERS, Patrice L.; ZHANG, Huawei; WILLIAMS, Jan Michael et al., 2023. Amyloid beta accumulation in TgF344-AD rats is associated with reduced cerebral capillary endothelial Kir2.1 expression and neurovascular uncoupling. *GeroScience*. Vol. 45, no. 5, s. 2909-2926. ISSN 2509-2723. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/s11357-023-00841-2.

67. FAYETTE, Dan, 2016. *Srovnání alternativní verze Montrealského kognitivního testu (MoCA-CZ 2) s jeho verzí základní (MoCA-CZ 1)*. Diplomová práce, vedoucí Kulišťák, Petr. Praha: Univerzita Karlova, Filozofická fakulta, Katedra psychologie.

68. FERRER, Isidro, 2024. Amyloid-β Pathology Is the Common Nominator Proteinopathy of the Primate Brain Aging. *Journal of Alzheimer's Disease*. Vol. 100, no. s1, s. S153-S164. ISSN 13872877. Dostupné z: https://doi.org/10.3233/JAD-240389.

69. FERRER-RAVENTÓS, Paula a BEYER, Katrin, 2021. Alternative platelet activation pathways and their role in neurodegenerative diseases. *Neurobiology of Disease*. Vol. 159, s. 105512. ISSN 09699961. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.nbd.2021.105512.

70. FIŠAR, Zdeněk; HANSÍKOVÁ, Hana; KŘÍŽOVÁ, Jana; JIRÁK, Roman; KITZLEROVÁ, Eva et al., 2019a. Activities of mitochondrial respiratory chain complexes in platelets of patients with Alzheimer's disease and

depressive disorder. *Mitochondrion*. Vol. 48, s. 67-77. ISSN 15677249. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.mito.2019.07.013.

71. FIŠAR, Zdeněk; HROUDOVÁ, Jana; HANSÍKOVÁ, Hana; SPÁČILOVÁ, Jana; LELKOVÁ, Petra et al., 2016. Mitochondrial Respiration in the Platelets of Patients with Alzheimer's Disease. *Current Alzheimer Research*. Vol. 13, no. 8, s. 930-941. ISSN 15672050. Dostupné z: https://doi.org/10.2174/1567205013666160314150856.

72. FIŠAR, Zdeněk; JIRÁK, Roman; ZVĚŘOVÁ, Martina; SETNIČKA, Vladimír; HABARTOVÁ, Lucie et al., 2019b. Plasma amyloid beta levels and platelet mitochondrial respiration in patients with Alzheimer's disease. *Clinical Biochemistry*. Vol. 72, s. 71-80. ISSN 00099120. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2019.04.003.

73. FOWLER, Caitlin F.; GOERZEN, Dana; DEVENYI, Gabriel A.; MADULARU, Dan; CHAKRAVARTY, M. Mallar et al., 2022. Neurochemical and cognitive changes precede structural abnormalities in the TgF344-AD rat model. *Brain Communications*. Vol. 4, no. 2, s. fcac072. ISSN 2632-1297. Dostupné z: https://doi.org/10.1093/braincomms/fcac072.

74. FREITAS, Sandra; SIMÕES, Mário R.; ALVES, Lara; VICENTE, Margarida a SANTANA, Isabel, 2012. Montreal Cognitive Assessment (MoCA): Validation Study for Vascular Dementia. *Journal of the International Neuropsychological Society*. Vol. 18, no. 6, s. 1031-1040. ISSN 1355-6177. Dostupné z: https://doi.org/10.1017/S135561771200077X.

75. GARCÍA-BERMÚDEZ, Mariana Yolotzin; VOHRA, Rupali; FREUDE, Kristine; WIJNGAARDEN, Peter van; MARTIN, Keith et al., 2023. Potential Retinal Biomarkers in Alzheimer's Disease. *International Journal of Molecular Sciences*. Vol. 24, no. 21, s. 15834. ISSN 1422-0067. Dostupné z: https://doi.org/10.3390/ijms242115834.

76. GARCIA‐ESPARCIA, Paula; KONETI, Anusha; RODRÍGUEZ‐OROZ, M. Cruz; GAGO, Belen; DEL RIO, José Antonio et al., 2018. Mitochondrial activity in the frontal cortex area 8 and angular gyrus in Parkinson's disease and Parkinson's disease with dementia. *Brain Pathology*. Vol. 28, no. 1, s. 43-57. ISSN 1015-6305. Dostupné z: https://doi.org/10.1111/bpa.12474.

77. GARCIA-ESPARCIA, Paula; LÓPEZ-GONZÁLEZ, Irene; GRAU-RIVERA, Oriol; GARCÍA-GARRIDO, María Francisca; KONETTI,

Anusha et al., 2017. Dementia with Lewy Bodies: Molecular Pathology in the Frontal Cortex in Typical and Rapidly Progressive Forms. *Frontiers in Neurology*. Vol. 8, s. 89. ISSN 1664-2295. Dostupné z: https://doi.org/10.3389/fneur.2017.00089.

78. GATTERER, Hannes; MENZ, Verena; SALAZAR-MARTINEZ, Eduardo; SUMBALOVA, Zuzana; GARCIA-SOUZA, Luiz Felipe et al., 2018. Exercise Performance, Muscle Oxygen Extraction and Blood Cell Mitochondrial Respiration after Repeated-Sprint and Sprint Interval Training in Hypoxia: A Pilot Study. *Journal of sports science & medicine*. Vol. 17, no. 3, s. 339–347. ISSN 1303-2968.

79. GHISO, Jorge; SHAYO, Marcos; CALERO, Miguel; NG, Douglas; TOMIDOKORO, Yasushi et al., 2004. Systemic Catabolism of Alzheimer's Aβ40 and Aβ42. *Journal of Biological Chemistry*. Vol. 279, no. 44, s. 45897-45908. ISSN 00219258. Dostupné z: https://doi.org/10.1074/jbc.M407668200.

80. GNAIGER, Erich, 2008. In: DYKENS, James A. a WILL, Yvonne (ed.). *Drug‐Induced Mitochondrial Dysfunction: Polarographic oxygen sensors, the oxygraph, and high-resolution respirometry to assess mitochondrial function*. John Wiley & Sons, s. 327-352. ISBN 9780470111314. Dostupné z: https://doi.org/10.1002/9780470372531.

81. GNAIGER, Erich, 2014. Mitochondrial Pathways and Respiratory Control An Introduction to OXPHOS Analysis. Online. In: Mitochondrial Pathways and Respiratory Control An Introduction to OXPHOS Analysis. 4th ed. Innsbruck: OROBOROS MiPNet Publications, s. 1-80. ISBN 978-3-9502399-8-0. Dostupné z: Dostupné z https://www.bioblast.at/index.php/Gnaiger_2014_MitoPathways. [cit. 2025-02-19].

82. GOEDERT, Michel, 2009. Oskar Fischer and the study of dementia. *Brain*. Vol. 132, no. 4, s. 1102-1111. ISSN 0006-8950. Dostupné z: https://doi.org/10.1093/brain/awn256.

83. GOMPERTS, Stephen N., 2016. Lewy Body Dementias. *CONTINUUM: Lifelong Learning in Neurology*. Vol. 22, no. 2, Dementia, s. 435-463. ISSN 1080-2371. Dostupné z: https://doi.org/10.1212/CON.0000000000000309.

84. GROSS, Vera S.; GREENBERG, Heather K.; BARANOV, Sergei V.; CARLSON, Greta M.; STAVROVSKAYA, Irina G. et al., 2011. Isolation of functional mitochondria from rat kidney and skeletal muscle without manual homogenization. *Analytical Biochemistry*. Vol. 418, no. 2, s. 213-223. ISSN 00032697. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.ab.2011.07.017.

85. GUERREIRO, Rita a BRAS, Jose, 2015. The age factor in Alzheimer's disease. *Genome Medicine*. Vol. 7, no. 1. ISSN 1756-994X. Dostupné z: https://doi.org/10.1186/s13073-015-0232-5.

86. GURALNIK, J. M.; SIMONSICK, E. M.; FERRUCCI, L.; GLYNN, R. J.; BERKMAN, L. F. et al., 1994. A Short Physical Performance Battery Assessing Lower Extremity Function: Association With Self-Reported Disability and Prediction of Mortality and Nursing Home Admission. *Journal of Gerontology*. Vol. 49, no. 2, s. M85-M94. ISSN 0022-1422. Dostupné z: https://doi.org/10.1093/geronj/49.2.M85.

87. GVOZDJÁKOVÁ, Anna; SUMBALOVÁ, Zuzana; KUCHARSKÁ, Jarmila; KOMLÓSI, Mária; RAUSOVÁ, Zuzana et al., 2020. Platelet Mitochondrial Respiration, Endogenous Coenzyme Q10 and Oxidative Stress in Patients with Chronic Kidney Disease. *Diagnostics*. Vol. 10, no. 3, s. 176. ISSN 2075-4418. Dostupné z: https://doi.org/10.3390/diagnostics10030176.

88. HARDY, John A. a HIGGINS, Gerald A., 1992. Alzheimer's Disease: The Amyloid Cascade Hypothesis. *Science*. 1992-04-10, Vol. 256, no. 5054, s. 184-185. ISSN 0036-8075. Dostupné z: https://doi.org/10.1126/science.1566067.

89. HEDGES, C. P.; WOODHEAD, J. S. T.; WANG, H. W.; MITCHELL, C. J.; CAMERON-SMITH, D. et al., 2019. Peripheral blood mononuclear cells do not reflect skeletal muscle mitochondrial function or adaptation to high-intensity interval training in healthy young men. *Journal of Applied Physiology*. Vol. 126, no. 2, s. 454-461. ISSN 8750-7587. Dostupné z: https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00777.2018.

90. HENLE, Jacob, 1841. *Allgemeine Anatomie : Lehre von den Mischungs- und Formbestandtheilen des menschlichen Körpers*. Online. Leipzig: Verlag von Leopold Voss. Dostupné z: https://archive.org/details/allgemeineanatom00henl. [cit. 2025-02-10].

91. HOGAN, David B.; FIEST, Kirsten M.; ROBERTS, Jodie I.; MAXWELL, Colleen J.; DYKEMAN, Jonathan et al., 2016a. The Prevalence and Incidence of Dementia with Lewy Bodies: a Systematic Review. *Canadian Journal of Neurological Sciences / Journal Canadien des Sciences Neurologiques*. Vol. 43, no. S1, s. S83-S95. ISSN 0317-1671. Dostupné z: https://doi.org/10.1017/cjn.2016.2.

92. HOGAN, David B.; JETTÉ, Nathalie; FIEST, Kirsten M.; ROBERTS, Jodie I.; PEARSON, Dawn et al., 2016b. The Prevalence and Incidence of Frontotemporal Dementia: a Systematic Review. *Canadian Journal of Neurological Sciences / Journal Canadien des Sciences Neurologiques*. Vol. 43, no. S1, s. S96-S109. ISSN 0317-1671. Dostupné z: https://doi.org/10.1017/cjn.2016.25.

93. HOLMEROVÁ, Iva; BALÁČKOVÁ, Nina; BAUMANOVÁ, Michaela; HÁJKOVÁ, Lucie; HRADCOVÁ, Dana et al., 2013. Strategie České alzheimerovské společnosti P-PA-IA: Péče a podpora lidem postiženým syndromem demence. *Geriatrie a Gerontologie*. Roč. 2, č. 3, s. 158-164. ISSN 1805-4684.

94. HOLMEROVÁ, Iva; JAROLÍMOVÁ, Eva a SUCHÁ, Jitka, 2007. *Péče o pacienty s kognitivní poruchou*. 1. vyd. Praha: EV public relations. ISBN 978-80-254-0177-4.

95. HOLSINGER, Tracey; PLASSMAN, Brenda L.; STECHUCHAK, Karen M.; BURKE, James R.; COFFMAN, Cynthia J. et al., 2012. Screening for Cognitive Impairment: Comparing the Performance of Four Instruments in Primary Care. *Journal of the American Geriatrics Society*. Vol. 60, no. 6, s. 1027-1036. ISSN 0002-8614. Dostupné z: https://doi.org/10.1111/j.1532-5415.2012.03967.x.

96. INGRAM, Donald K., 2000. Age-related decline in physical activity: generalization to nonhumans. *Medicine & Science in Sports & Exercise*. Vol. 32, no. 9, s. 1623-1629. ISSN 0195-9131. Dostupné z: https://doi.org/10.1097/00005768-200009000-00016.

97. IQBAL, K.; LIU, F.; GONG, C.-X. a GRUNDKE-IQBAL, I., 2010. Tau in Alzheimer Disease and Related Tauopathies. *Current Alzheimer Research*. Vol. 7, no. 8, s. 656-664. ISSN 15672050. Dostupné z: https://doi.org/10.2174/156720510793611592.

98. ISLAM, Maheen; MAZUMDER, Mridul; SCHWABE-WARF, Derek; STEPHAN, Yannick; SUTIN, Angelina R. et al., 2019. Personality Changes With Dementia From the Informant Perspective: New Data and Meta-Analysis. *Journal of the American Medical Directors Association*. Vol. 20, no. 2, s. 131-137. ISSN 15258610. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.jamda.2018.11.004.

99. ISLAM, Nayaar; HASHEM, Rola; GAD, Maryse; BROWN, Aime; LEVIS, Brooke et al., 2023. Accuracy of the Montreal Cognitive Assessment tool for detecting mild cognitive impairment: A systematic review and meta‐analysis. *Alzheimer's & Dementia*. Vol. 19, no. 7, s. 3235-3243. ISSN 1552-5260. Dostupné z: https://doi.org/10.1002/alz.13040.

100. JACK, Clifford R.; BENNETT, David A.; BLENNOW, Kaj; CARRILLO, Maria C.; DUNN, Billy et al., 2018. NIA‐AA Research Framework: Toward a biological definition of Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia*. Vol. 14, no. 4, s. 535-562. ISSN 1552-5260. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.jalz.2018.02.018.

101. JEDLIČKA, Jan; KUNC, Radovan a KUNCOVÁ, Jitka, 2021. Mitochondrial Respiration of Human Platelets in Young Adult and Advanced Age – Seahorse or O2k? *Physiological Research*. Vol. 70, no. S3, s. S369-S379. ISSN 1802-9973. Dostupné z: https://doi.org/10.33549/physiolres.934812.

102. JEDLIČKA, Jan; TŮMA, Zdeněk; RAZAK, Karim; KUNC, Radovan; KALA, Annu et al., 2022. Impact of Aging on Mitochondrial Respiration in Various Organs. *Physiological Research*. Vol. 71, no. Suppl. 2, s. S227-S236. ISSN 1802-9973. Dostupné z: https://doi.org/10.33549/physiolres.934995.

103. JEFFERSON, Angela L.; BEISER, Alexa S.; HIMALI, Jayandra J.; SESHADRI, Sudha; O'DONNELL, Christopher J. et al., 2015. Low Cardiac Index Is Associated With Incident Dementia and Alzheimer Disease. *Circulation*. Vol. 131, no. 15, s. 1333-1339. ISSN 0009-7322. Dostupné z: https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.114.012438.

104. JIN, Ming; SHEPARDSON, Nina; YANG, Ting; CHEN, Gang; WALSH, Dominic et al., 2011. Soluble amyloid β-protein dimers isolated from Alzheimer cortex directly induce Tau hyperphosphorylation and neuritic degeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2011-04-05,

Vol. 108, no. 14, s. 5819-5824. ISSN 0027-8424. Dostupné z: https://doi.org/10.1073/pnas.1017033108.

105. JIN, Wang-Sheng; BU, Xian-Le; WANG, Ye-Ran; LI, Ling; LI, Wei-Wei et al., 2017. Reduced Cardiovascular Functions in Patients with Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease*. Vol. 58, no. 3, s. 919-925. ISSN 13872877. Dostupné z: https://doi.org/10.3233/JAD-170088.

106. JIRÁK, Roman a LAŇKOVÁ, Jaroslava, 2007. *Demence: doporučený diagnostický a léčebný postup pro všeobecné praktické lékaře : 2007*. Doporučené postupy pro praktické lékaře. Praha: Společnost všeobecného lékařství ČLS JEP. ISBN 978-80-86998-13-8.

107. JU, Yanxiu; LI, Songtao; KONG, Xiangyi a ZHAO, Qing, 2024. Exploring fatty acid metabolism in Alzheimer's disease: the key role of CPT1A. *Scientific Reports*. Vol. 14, no. 1, s. 31483. ISSN 2045-2322. Dostupné z: https://doi.org/10.1038/s41598-024-82999-z.

108. KADEŘÁVKOVÁ, Lenka, 2020. *Praktičtí lékaři nabídnou od ledna více preventivních výkonů*. Online. Dostupné z: https://www.japraktik.cz/odborne-clanky/prakticti-lekari-nabidnou-od-ledna-vice-preventivnich-vykonu-56310. [cit. 2025-02-24].

109. KALVACH, Zdeněk; ZADÁK, Zdeněk; JIRÁK, Roman; ZAVÁZALOVÁ, Helena; SUCHARDA, Petr et al., 2004. *Geriatrie a gerontologie*. 1. vyd. Praha: Grada Publishing. ISBN 80-247-0548-6.

110. KATZMAN, Robert, 1976. The Prevalence and Malignancy of Alzheimer Disease. A major killer. *Archives of Neurology*. Vol. 33, no. 4. ISSN 0003-9942. Dostupné z: https://doi.org/10.1001/archneur.1976.00500040001001.

111. KAVKOVA, Michaela; ZIKMUND, Tomas; KALA, Annu; SALPLACHTA, Jakub; PROSKAUER PENA, Stephanie L. et al., 2021. Contrast enhanced X-ray computed tomography imaging of amyloid plaques in Alzheimer disease rat model on lab based micro CT system. *Scientific Reports*. Vol. 11, no. 1, s. 5999. ISSN 2045-2322. Dostupné z: https://doi.org/10.1038/s41598-021-84579-x.

112. KAZEMEINI, Sarah; NADEEM-TARIQ, Ahmed; SHIH, Ryan; RAFANAN, John; GHANI, Nabih et al., 2024. From Plaques to Pathways in Alzheimer's

Disease: The Mitochondrial-Neurovascular-Metabolic Hypothesis. *International Journal of Molecular Sciences*. Vol. 25, no. 21, s. 11720. ISSN 1422-0067. Dostupné z: https://doi.org/10.3390/ijms252111720.

113. KILKSON, H.; HOLME, S. a MURPHY, S., 1984. Platelet metabolism during storage of platelet concentrates at 22 degrees C. *Blood*. Vol. 64, no. 2, s. 406–414. ISSN 1528-0020.

114. KITAGUCHI, Nobuya; TAKAHASHI, Yasuyuki; TOKUSHIMA, Yasuo; SHIOJIRI, Satoshi a ITO, Hirataka, 1988. Novel precursor of Alzheimer's disease amyloid protein shows protease inhibitory activity. *Nature*. Vol. 331, no. 6156, s. 530-532. ISSN 0028-0836. Dostupné z: https://doi.org/10.1038/331530a0.

115. KLYUCHEREV, Timofey O.; OLSZEWSKI, Pawel; SHALIMOVA, Alena A.; CHUBAREV, Vladimir N.; TARASOV, Vadim V. et al., 2022. Advances in the development of new biomarkers for Alzheimer's disease. *Translational Neurodegeneration*. Vol. 11, no. 1, s. 25. ISSN 2047-9158. Dostupné z: https://doi.org/10.1186/s40035-022-00296-z.

116. KOPEČEK, Miloslav; STEPANKOVA, Hana; LUKAVSKY, Jiri; RIPOVA, Daniela; NIKOLAI, Tomas et al., 2016. Montreal cognitive assessment (MoCA): Normative data for old and very old Czech adults. *Applied Neuropsychology: Adult*. Vol. 24, no. 1, s. 23-29. ISSN 2327-9095. Dostupné z: https://doi.org/10.1080/23279095.2015.1065261.

117. KUJOTH, G. C.; HIONA, A.; PUGH, T. D.; SOMEYA, S.; PANZER, K. et al., 2005. Mitochondrial DNA Mutations, Oxidative Stress, and Apoptosis in Mammalian Aging. *Science*. Vol. 309, no. 5733, s. 481-484. ISSN 0036-8075. Dostupné z: https://doi.org/10.1126/science.1112125.

118. KUJOTH, Gregory C a PROLLA, Tomas A, 2008. Evolving insight into the role of mitochondrial DNA mutations in aging. *Experimental Gerontology*. Vol. 43, no. 1, s. 20-23. ISSN 05315565. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.exger.2007.09.010.

119. KUNC, Radovan; JEDLIČKA, Jan a KUNCOVÁ, Jitka, 2022. Patofyziologie Alzheimerovy choroby – historie, současnost, kontroverze. *Československá fyziologie*. Roč. 71, č. 1, s. 12-20. ISSN 1210-6313.

120. LESKELÄ, Stina; HOFFMANN, Dorit; ROSTALSKI, Hannah; HUBER, Nadine; WITTRAHM, Rebekka et al., 2021. FTLD Patient–Derived Fibroblasts Show Defective Mitochondrial Function and Accumulation of p62. *Molecular Neurobiology*. Vol. 58, no. 11, s. 5438-5458. ISSN 0893-7648. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/s12035-021-02475-x.

121. LI, Hui; LIU, Yi; LIN, Li-Ting; WANG, Xue-Rui; DU, Si-Qi et al., 2016. Acupuncture reversed hippocampal mitochondrial dysfunction in vascular dementia rats. *Neurochemistry International*. Vol. 92, s. 35-42. ISSN 01970186. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.neuint.2015.12.001.

122. LIU, Pei-Pei; XIE, Yi; MENG, Xiao-Yan a KANG, Jian-Sheng, 2019. History and progress of hypotheses and clinical trials for Alzheimer's disease. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. Vol. 4, no. 1. ISSN 2059-3635. Dostupné z: https://doi.org/10.1038/s41392-019-0063-8.

123. LIU, Yu-Hui; XIANG, Yang; WANG, Ye-Ran; JIAO, Shu-Sheng; WANG, Qing-Hua et al., 2015. Association Between Serum Amyloid-Beta and Renal Functions: Implications for Roles of Kidney in Amyloid-Beta Clearance. *Molecular Neurobiology*. Vol. 52, no. 1, s. 115-119. ISSN 0893-7648. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/s12035-014-8854-y.

124. LIVINGSTON, Gill; HUNTLEY, Jonathan; SOMMERLAD, Andrew; AMES, David; BALLARD, Clive et al., 2020. Dementia prevention, intervention, and care: 2020 report of the Lancet Commission. *The Lancet*. Vol. 396, no. 10248, s. 413-446. ISSN 01406736. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30367-6.

125. LLEÓ, Alberto; IRWIN, David J.; ILLÁN-GALA, Ignacio; MCMILLAN, Corey T.; WOLK, David A. et al., 2018. A 2-Step Cerebrospinal Algorithm for the Selection of Frontotemporal Lobar Degeneration Subtypes. *JAMA Neurology*. Vol. 75, no. 6, s. 738-745. ISSN 2168-6149. Dostupné z: https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2018.0118.

126. LÓPEZ-CUEVAS, R.; BAQUERO-TOLEDO, M.; CUEVAS-JIMÉNEZ, A.; MARTÍN-IBÁÑEZ, N.; PASCUAL-COSTA, R. et al., 2023. Prognostic value of cerebrospinal fluid biomarkers in mild cognitive impairment due to Alzheimer disease. *Neurología (English Edition)*. Vol. 38, no. 4, s. 262-269. ISSN 21735808. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.nrleng.2020.07.024.

127. MAHAPATRA, Gargi; GAO, Zhengrong; BATEMAN, James R.; LOCKHART, Samuel Neal; BERGSTROM, Jaclyn et al., 2023. Blood‐based bioenergetic profiling reveals differences in mitochondrial function associated with cognitive performance and Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia*. Vol. 19, no. 4, s. 1466-1478. ISSN 1552-5260. Dostupné z: https://doi.org/10.1002/alz.12731.

128. MALAY, Sunitha a CHUNG, Kevin C., 2012. The Choice of Controls for Providing Validity and Evidence in Clinical Research. *Plastic & Reconstructive Surgery*. Vol. 130, no. 4, s. 959-965. ISSN 0032-1052. Dostupné z: https://doi.org/10.1097/PRS.0b013e318262f4c8.

129. MANCUSO, Michelangelo; FILOSTO, Massimiliano; BOSETTI, Francesca; CERAVOLO, Roberto; ROCCHI, Anna et al., 2003. Decreased platelet cytochrome c oxidase activity is accompanied by increased blood lactate concentration during exercise in patients with Alzheimer disease. *Experimental Neurology*. Vol. 182, no. 2, s. 421-426. ISSN 00144886. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/S0014-4886(03)00092-X.

130. MARTÍNEZ-REYES, Inmaculada a CHANDEL, Navdeep S., 2020. Mitochondrial TCA cycle metabolites control physiology and disease. *Nature Communications*. Vol. 11, no. 1, s. 102. ISSN 2041-1723. Dostupné z: https://doi.org/10.1038/s41467-019-13668-3.

131. MASTRONENI, Diego; GROVER, Andrew; DELVAUX, Elaine; WHITESIDE, Charisse; COLEMAN, Paul D. et al., 2010. Epigenetic changes in Alzheimer's disease: Decrements in DNA methylation. *Neurobiology of Aging*. Vol. 31, no. 12, s. 2025-2037. ISSN 01974580. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2008.12.005.

132. MÁTL, Ondřej a MÁTLOVÁ, Martina, 2015. *Zpráva o stavu demence 2015: jaký názor má veřejnost a co prezentují média?* Praha: Česká alzheimerovská společnost. ISBN 978-80-86541-45-7.

133. MCKEITH, Ian G.; BOEVE, Bradley F.; DICKSON, Dennis W.; HALLIDAY, Glenda; TAYLOR, John-Paul et al., 2017. Diagnosis and management of dementia with Lewy bodies. *Neurology*. Vol. 89, no. 1, s. 88-100. ISSN 0028-3878. Dostupné z: https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000004058.

134. MCKHANN, Guy; DRACHMAN, David; FOLSTEIN, Marshall; KATZMAN, Robert; PRICE, Donald et al., 1984. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease. *Neurology*. Vol. 34, no. 7, s. 939-939. ISSN 0028-3878. Dostupné z: https://doi.org/10.1212/WNL.34.7.939.

135. MCKHANN, Guy M.; KNOPMAN, David S.; CHERTKOW, Howard; HYMAN, Bradley T.; JACK, Clifford R. et al., 2011. The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging‐Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia*. Vol. 7, no. 3, s. 263-269. ISSN 1552-5260. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.jalz.2011.03.005.

136. MIELKE, Michelle M.; HAGEN, Clinton E.; XU, Jing; CHAI, Xiyun; VEMURI, Prashanthi et al., 2018. Plasma phospho‐tau181 increases with Alzheimer's disease clinical severity and is associated with tau‐ and amyloid‐positron emission tomography. *Alzheimer's & Dementia*. Vol. 14, no. 8, s. 989-997. ISSN 1552-5260. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.jalz.2018.02.013.

137. MITCHELL, Sara B. a BLACK, Sandra E., 2016. Screening for mild cognitive impairment: If not now, when? *Canadian Medical Association Journal*. Vol. 188, no. 1, s. 15-16. ISSN 0820-3946. Dostupné z: https://doi.org/10.1503/cmaj.151411.

138. MODY, Lona; MILLER, Douglas K.; MCGLOIN, Joanne M.; FREEMAN, Marcie; MARCANTONIO, Edward R. et al., 2008. Recruitment and Retention of Older Adults in Aging Research. *Journal of the American Geriatrics Society*. Vol. 56, no. 12, s. 2340-2348. ISSN 0002-8614. Dostupné z: https://doi.org/10.1111/j.1532-5415.2008.02015.x.

139. MONTEIRO-CARDOSO, Vera; CASTRO, Marisa; OLIVEIRA, M.M.; MOREIRA, Paula; PEIXOTO, Francisco et al., 2015. Age-Dependent Biochemical Dysfunction in Skeletal Muscle of Triple- Transgenic Mouse Model of Alzheimer`s Disease. *Current Alzheimer Research*. Vol. 12, no. 2, s. 100-115. ISSN 15672050. Dostupné z: https://doi.org/10.2174/1567205012666150204124852.

140. MONTERO-ODASSO, Manuel; ZOU, Guangyong; SPEECHLEY, Mark; ALMEIDA, Quincy J.; LIU-AMBROSE, Teresa et al., 2023. Effects of Exercise Alone or Combined With Cognitive Training and Vitamin D

Supplementation to Improve Cognition in Adults With Mild Cognitive Impairment. *JAMA Network Open*. Vol. 6, no. 7, s. e2324465. ISSN 2574-3805. Dostupné z: https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2023.24465.

141. MOOKERJEE, Shona A.; GERENCSER, Akos A.; NICHOLLS, David G. a BRAND, Martin D., 2017. Quantifying intracellular rates of glycolytic and oxidative ATP production and consumption using extracellular flux measurements. *Journal of Biological Chemistry*. Vol. 292, no. 17, s. 7189-7207. ISSN 00219258. Dostupné z: https://doi.org/10.1074/jbc.M116.774471.

142. MORAIS, Flavio M.; RIBEIRO, Angela M.; MOREIRA, Fabricio A. a SILVA, Pollyanna V. G., 2021. Systematic review and meta-analysis on the role of mitochondrial cytochrome c oxidase in Alzheimer's disease. *Acta Neuropsychiatrica*. Vol. 33, no. 2, s. 55-64. ISSN 0924-2708. Dostupné z: https://doi.org/10.1017/neu.2020.43.

143. MORREY, William J; CEYZÉRIAT, Kelly; AMOSSÉ, Quentin; BADINA, Aurélien M; DICKIE, Ben et al., 2025. Early metabolic changes in the brain of Alzheimer's disease rats are driven by GLAST+ cells. Online. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. ISSN 0271-678X. Dostupné z: https://doi.org/10.1177/0271678X251318923. [cit. 2025-03-20].

144. MORRIS, Elizabeth; CHALKIDOU, Anastasia; HAMMERS, Alexander; PEACOCK, Janet; SUMMERS, Jennifer et al., 2016. Diagnostic accuracy of 18F amyloid PET tracers for the diagnosis of Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*. Vol. 43, no. 2, s. 374-385. ISSN 1619-7070. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/s00259-015-3228-x.

145. NASREDDINE, Ziad S.; PHILLIPS, Natalie A.; BÉDIRIAN, Valérie; CHARBONNEAU, Simon; WHITEHEAD, Victor et al., 2005. The Montreal Cognitive Assessment, MoCA: A Brief Screening Tool For Mild Cognitive Impairment. *Journal of the American Geriatrics Society*. Vol. 53, no. 4, s. 695-699. ISSN 0002-8614. Dostupné z: https://doi.org/10.1111/j.1532-5415.2005.53221.x.

146. NAVARRO, Ana a BOVERIS, Alberto, 2007. The mitochondrial energy transduction system and the aging process. *American Journal of*

Physiology-Cell Physiology. Vol. 292, no. 2, s. C670-C686. ISSN 0363-6143. Dostupné z: https://doi.org/10.1152/ajpcell.00213.2006.

147. NEUŽIL, Jiří, 2020. *Nové přístupy k léčbě nádorových onemocnění: zaměřeno na mitochondrie*. Slavnostní přednášky Akademie věd České republiky: špičkový výzkum ve veřejném zájmu. Praha: Academia. ISBN 978-80-200-3137-2.

148. OJAIMI, Joseline; MASTERS, Colin L.; OPESKIN, Ken; MCKELVIE, Penny a BYRNE, Edward, 1999. Mitochondrial respiratory chain activity in the human brain as a function of age. *Mechanisms of Ageing and Development*. Vol. 111, no. 1, s. 39-47. ISSN 00476374. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/S0047-6374(99)00071-8.

149. OWENS, Douglas K.; DAVIDSON, Karina W.; KRIST, Alex H.; BARRY, Michael J.; CABANA, Michael et al., 2020. Screening for Cognitive Impairment in Older Adults. *JAMA*. 2020-02-25, Vol. 323, no. 8. ISSN 0098-7484. Dostupné z: https://doi.org/10.1001/jama.2020.0435.

150. PALMQVIST, Sebastian; JANELIDZE, Shorena; STOMRUD, Erik; ZETTERBERG, Henrik; KARL, Johann et al., 2019. Performance of Fully Automated Plasma Assays as Screening Tests for Alzheimer Disease–Related β-Amyloid Status. *JAMA Neurology*. Vol. 76, no. 9, s. 1060-1069. ISSN 2168-6149. Dostupné z: https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2019.1632.

151. PALMQVIST, Sebastian; ZETTERBERG, Henrik; MATTSSON, Niklas; JOHANSSON, Per; MINTHON, Lennart et al., 2015. Detailed comparison of amyloid PET and CSF biomarkers for identifying early Alzheimer disease. *Neurology*. Vol. 85, no. 14, s. 1240-1249. ISSN 0028-3878. Dostupné z: https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000001991.

152. PAREY, Kristian; WIRTH, Christophe; VONCK, Janet a ZICKERMANN, Volker, 2020. Respiratory complex I — structure, mechanism and evolution. *Current Opinion in Structural Biology*. Vol. 63, s. 1-9. ISSN 0959440X. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.sbi.2020.01.004.

153. PESTA, Dominik a GNAIGER, Erich, 2012. *High-Resolution Respirometry: OXPHOS Protocols for Human Cells and Permeabilized Fibers from Small Biopsies of Human Muscle.* In: PALMEIRA, Carlos M. a MORENO, António J. (ed.). *Mitochondrial Bioenergetics*. Methods in Molecular

Biology. Totowa, NJ: Humana Press, s. 25-58. ISBN 978-1-61779-381-3. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/978-1-61779-382-0_3.

154. PETERSEN, Ronald C; LOPEZ, Oscar; ARMSTRONG, Melissa J; GETCHIUS, Thomas S D; GANGULI, Mary et al., 2018. Practice guideline update summary: Mild cognitive impairment: Report of the Guideline Development, Dissemination, and Implementation Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology*. Vol. 90, no. 3, s. 126-135. ISSN 0028-3878. Dostupné z: https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000004826.

155. PETRUŞ, A.; LIGHEZAN, D.; DĂNILĂ, M.; DUICU, O.; STURZA, A. et al., 2019. Assessment of Platelet Respiration as Emerging Biomarker of Disease. *Physiological Research*. Vol. 68, no. 3, s. 347-363. ISSN 1802-9973. Dostupné z: https://doi.org/10.33549/physiolres.934032.

156. PIDRMAN, Vladimír, 2007. *Demence*. Psyché. Praha: Grada. ISBN 978-80-247-1490-5.

157. PINI, Lorenzo; PIEVANI, Michela; BOCCHETTA, Martina; ALTOMARE, Daniele; BOSCO, Paolo et al., 2016. Brain atrophy in Alzheimer's Disease and aging. *Ageing Research Reviews*. Vol. 30, no. 25-48. ISSN 15681637. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.arr.2016.01.002.

158. PITKALA, Kaisu H a STRANDBERG, Timo E, 2022. Clinical trials in older people. *Age and Ageing*. Vol. 51, no. 5, s. afab282. ISSN 0002-0729. Dostupné z: https://doi.org/10.1093/ageing/afab282.

159. PORTER, Craig; HURREN, Nicholas M.; COTTER, Matthew V.; BHATTARAI, Nisha; REIDY, Paul T. et al., 2015. Mitochondrial respiratory capacity and coupling control decline with age in human skeletal muscle. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. Vol. 309, no. 3, s. E224-E232. ISSN 0193-1849. Dostupné z: https://doi.org/10.1152/ajpendo.00125.2015.

160. POTTIE, Kevin; RAHAL, Rana; JARAMILLO, Alejandra; BIRTWHISTLE, Richard; THOMBS, Brett D. et al., 2016. Recommendations on screening for cognitive impairment in older adults. *Canadian Medical Association Journal*. 2016-01-04, Vol. 188, no. 1, s. 37-46. ISSN 0820-3946. Dostupné z: https://doi.org/10.1503/cmaj.141165.

161. PROSKAUER PENA, Stephanie L.; MALLOUPPAS, Konstantinos; OLIVEIRA, Andre M. G.; ZITRICKY, Frantisek; NATARAJ, Athira et al., 2021. Early Spatial Memory Impairment in a Double Transgenic Model of Alzheimer's Disease TgF-344 AD. *Brain Sciences*. Vol. 11, no. 10, s. 1300. ISSN 2076-3425. Dostupné z: https://doi.org/10.3390/brainsci11101300.

162. PURIS, Elena; AURIOLA, Seppo; PETRALLA, Sabrina; HARTMAN, Robin; GYNTHER, Mikko et al., 2022. Altered protein expression of membrane transporters in isolated cerebral microvessels and brain cortex of a rat Alzheimer's disease model. *Neurobiology of Disease*. Vol. 169, s. 105741. ISSN 09699961. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.nbd.2022.105741.

163. QIU, Yongzhi; BROWN, Ashley C.; MYERS, David R.; SAKURAI, Yumiko; MANNINO, Robert G. et al., 2014. Platelet mechanosensing of substrate stiffness during clot formation mediates adhesion, spreading, and activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. Vol. 111, no. 40, s. 14430-14435. ISSN 0027-8424. Dostupné z: https://doi.org/10.1073/pnas.1322917111.

164. RAHAYEL, Shady; TREMBLAY, Christina; VO, Andrew; MISIC, Bratislav; LEHÉRICY, Stéphane et al., 2023. Mitochondrial function-associated genes underlie cortical atrophy in prodromal synucleinopathies. *Brain*. Vol. 146, no. 8, s. 3301-3318. ISSN 0006-8950. Dostupné z: https://doi.org/10.1093/brain/awad044.

165. RAJU, Raghavan; BIXI, Jian; HUBARD, William a CHAUDRY, Irshad, 2011. The Mitoscriptome in Aging and Disease. *Aging and disease*. Vol. 2, no. 2, s. 174-180. ISSN 2152-5250.

166. RAMÍREZ-VÉLEZ, Robinson; LÓPEZ SÁEZ DE ASTEASU, M.; MORLEY, J.E.; CANO-GUTIERREZ, C.A. a IZQUIERDO, M., 2021. Performance of the Short Physical Performance Battery in Identifying the Frailty Phenotype and Predicting Geriatric Syndromes in Community-Dwelling Elderly. *The Journal of nutrition, health and aging*. Vol. 25, no. 2, s. 209-217. ISSN 12797707. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/s12603-020-1484-3.

167. RAVI, Saranya; CHACKO, Balu; SAWADA, Hirotaka; KRAMER, Philip A.; JOHNSON, Michelle S. et al., 2015. Metabolic Plasticity in Resting and Thrombin Activated Platelets. *PLOS ONE*. Vol. 10, no. 4, s. e0123597. ISSN 1932-6203. Dostupné z: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123597.

168. RICCIARELLI, Roberta a FEDELE, Ernesto, 2017. The Amyloid Cascade Hypothesis in Alzheimer's Disease: It's Time to Change Our Mind. *Current Neuropharmacology*. Vol. 15, no. 6, s. 926-935. ISSN 1570159X. Dostupné z: https://doi.org/10.2174/1570159X15666170116143743.

169. ROSE, Shannon; CARVALHO, Eugenia; DIAZ, Eva C.; COTTER, Matthew; BENNURI, Sirish C. et al., 2019. A comparative study of mitochondrial respiration in circulating blood cells and skeletal muscle fibers in women. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. Vol. 317, no. 3, s. E503-E512. ISSN 0193-1849. Dostupné z: https://doi.org/10.1152/ajpendo.00084.2019.

170. ROSSMANN, Marlies P.; DUBOIS, Sonia M.; AGARWAL, Suneet a ZON, Leonard I., 2021. Mitochondrial function in development and disease. *Disease Models & Mechanisms*. Vol. 14, no. 6, s. dmm048912. ISSN 1754-8403. Dostupné z: https://doi.org/10.1242/dmm.048912.

171. RUTKOWSKY, Jennifer M.; ROLAND, Zabrisky; VALENZUELA, Anthony; NGUYEN, An B.; PARK, Heui Hye et al., 2024. The impact of continuous and intermittent ketogenic diets on cognitive behavior, motor function, and blood lipids in TgF344-AD rats. *Aging*. Vol. 16, no. 7, s. 5811–5828. ISSN 1945-4589. Dostupné z: https://doi.org/10.18632/aging.205741.

172. SACHDEV, Perminder; KALARIA, Raj; O'BRIEN, John; SKOOG, Ingmar; ALLADI, Suvarna et al., 2014. Diagnostic Criteria for Vascular Cognitive Disorders. *Alzheimer Disease & Associated Disorders*. Vol. 28, no. 3, s. 206-218. ISSN 0893-0341. Dostupné z: https://doi.org/10.1097/WAD.0000000000000034.

173. SAGAN, Lynn, 1967. On the origin of mitosing cells. *Journal of Theoretical Biology*. Vol. 14, no. 3, s. 255-274. ISSN 00225193. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/0022-5193(67)90079-3.

174. SALMON, Eric; COLLETTE, Fabienne a BASTIN, Christine, 2024. Cerebral glucose metabolism in Alzheimer's disease. *Cortex*. Vol. 179, no. oct., s. 50-61. ISSN 00109452. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.cortex.2024.07.004.

175. SCHÄGGER, Hermann, 2001. Respiratory Chain Supercomplexes. *IUBMB Life*. Vol. 52, no. 3-5, s. 119-128. ISSN 1521-6543. Dostupné z: https://doi.org/10.1080/15216540152845911.

176. SCHEFFLER, Immo E., 2008. *Mitochondria*. 2nd ed. Hoboken, N.J.: Wiley-Liss. ISBN 978-0-470-04073-7. Dostupné také z: http://www.loc.gov/catdir/toc/ecip0717/2007017348.html.

177. SEITZ, Dallas P; CHAN, Calvin CH; NEWTON, Hailey T; GILL, Sudeep S; HERRMANN, Nathan et al., 2021. Mini-Cog for the detection of dementia within a primary care setting. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. Vol. 2021, no. 7, s. CD011415. ISSN 14651858. Dostupné z: https://doi.org/10.1002/14651858.CD011415.pub3.

178. SELKOE, Dennis J a HARDY, John, 2016. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Molecular Medicine*. Vol. 8, no. 6, s. 595-608. ISSN 1757-4676. Dostupné z: https://doi.org/10.15252/emmm.201606210.

179. SERRANO-POZO, A.; FROSCH, M. P.; MASLIAH, E. a HYMAN, B. T., 2011. Neuropathological Alterations in Alzheimer Disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. Vol. 1, no. 1, s. a006189. ISSN 2157-1422. Dostupné z: https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006189.

180. ŠERÝ, Omar; POVOVÁ, Jana; MÍŠEK, Ivan; PEŠÁK, Lukáš a JANOUT, Vladimír, 2013. Molecular mechanisms of neuropathological changes in Alzheimer’s disease: a review. *Folia Neuropathologica*. Vol. 51, no. 1, s. 1-9. ISSN 1641-4640. Dostupné z: https://doi.org/10.5114/fn.2013.34190.

181. SHANKAR, Ganesh M; LI, Shaomin; MEHTA, Tapan H; GARCIA-MUNOZ, Amaya; SHEPARDSON, Nina E et al., 2008. Amyloid-β protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nature Medicine*. Vol. 14, no. 8, s. 837-842. ISSN 1078-8956. Dostupné z: https://doi.org/10.1038/nm1782.

182. SHARMA, Piyoosh; SRIVASTAVA, Pavan; SETH, Ankit; TRIPATHI, Prabhash Nath; BANERJEE, Anupam G. et al., 2019. Comprehensive review of mechanisms of pathogenesis involved in Alzheimer’s disease and potential therapeutic strategies. *Progress in Neurobiology*. Vol. 174, no. 53-89. ISSN 03010082. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2018.12.006.

183. SHEN, Qiuhua; CINTRON, Samantha A. a PIERCE, Janet D., 2024. Platelet and Leukocyte Mitochondrial Function With Cardiac Function and Self-Reported Health Status Among Obese Patients With Heart Failure. *Nursing Research*. Vol. 73, no. 4, s. 294-303. ISSN 1538-9847. Dostupné z: https://doi.org/10.1097/NNR.0000000000000723.

184. SHI, Chun; GUO, Kaihua; YEW, David T.; YAO, Zhibin; FORSTER, E. Lucy et al., 2008. Effects of ageing and Alzheimer's disease on mitochondrial function of human platelets. *Experimental Gerontology*. Vol. 43, no. 6, s. 589-594. ISSN 05315565. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.exger.2008.02.004.

185. SIMPSON, Ian A.; CHUNDU, Koteswara R.; DAVIES‐HILL, Theresa; HONER, William G. a DAVIES, Peter, 1994. Decreased concentrations of GLUT1 and GLUT3 glucose transporters in the brains of patients with Alzheimer's disease. *Annals of Neurology*. Vol. 35, no. 5, s. 546-551. ISSN 0364-5134. Dostupné z: https://doi.org/10.1002/ana.410350507.

186. SJÖVALL, Fredrik; EHINGER, Johannes K.H.; MARELSSON, Sigurður E.; MOROTA, Saori; ÅSANDER FROSTNER, Eleonor et al., 2013. Mitochondrial respiration in human viable platelets—Methodology and influence of gender, age and storage. *Mitochondrion*. Vol. 13, no. 1, s. 7-14. ISSN 15677249. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.mito.2012.11.001.

187. SPECHT, Jule; EGLOFF, Boris a SCHMUKLE, Stefan C., 2011. Stability and change of personality across the life course: The impact of age and major life events on mean-level and rank-order stability of the Big Five. *Journal of Personality and Social Psychology*. Vol. 101, no. 4, s. 862-882. ISSN 1939-1315. Dostupné z: https://doi.org/10.1037/a0024950.

188. SPERLING, Reisa A.; AISEN, Paul S.; BECKETT, Laurel A.; BENNETT, David A.; CRAFT, Suzanne et al., 2011. Toward defining the preclinical stages of Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging‐Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia*. Vol. 7, no. 3, s. 280-292. ISSN 1552-5260. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.jalz.2011.03.003.

189. STEFFEN, Johannes; KROHN, Markus; PAARMANN, Kristin; SCHWITLICK, Christina; BRÜNING, Thomas et al., 2016. Revisiting rodent models: Octodon degus as Alzheimer's disease model? *Acta*

Neuropathologica Communications. Vol. 4, no. 1, s. 91. ISSN 2051-5960. Dostupné z: https://doi.org/10.1186/s40478-016-0363-y.

190. STOCKER, Hannah; BEYER, Léon; TRARES, Kira; PERNA, Laura; RUJESCU, Dan et al., 2023. Association of Kidney Function With Development of Alzheimer Disease and Other Dementias and Dementia-Related Blood Biomarkers. *JAMA Network Open*. Vol. 6, no. 1, s. e2252387. ISSN 2574-3805. Dostupné z: https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2022.52387.

191. SUN, Rui; GE, Binqian; WU, Shiyu; LI, Huiling a LIN, Lu, 2023. Optimal cut-off MoCA score for screening for mild cognitive impairment in elderly individuals in China: A systematic review and meta-analysis. *Asian Journal of Psychiatry*. Vol. 87, no. July, s. 103691. ISSN 18762018. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.ajp.2023.103691.

192. SWERDLOW, Russell H. a KHAN, Shaharyar M., 2009. The Alzheimer's disease mitochondrial cascade hypothesis: An update. *Experimental Neurology*. Vol. 218, no. 2, s. 308-315. ISSN 00144886. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2009.01.011.

193. SWERDLOW, Russell H a KHAN, Shaharyar M, 2004. A “mitochondrial cascade hypothesis” for sporadic Alzheimer's disease. *Medical Hypotheses*. Vol. 63, no. 1, s. 8-20. ISSN 03069877. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.mehy.2003.12.045.

194. TAMAKI, Chihiro; OHTSUKI, Sumio; IWATSUBO, Takeshi; HASHIMOTO, Tadafumi; YAMADA, Kaoru et al., 2006. Major Involvement of Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 1 in the Clearance of Plasma Free Amyloid β-Peptide by the Liver. *Pharmaceutical Research*. Vol. 23, no. 7, s. 1407-1416. ISSN 0724-8741. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/s11095-006-0208-7.

195. TRONCONE, Luca; LUCIANI, Marco; COGGINS, Matthew; WILKER, Elissa H.; HO, Cheng-Ying et al., 2016. Aβ Amyloid Pathology Affects the Hearts of Patients With Alzheimer’s Disease. *Journal of the American College of Cardiology*. Vol. 68, no. 22, s. 2395-2407. ISSN 07351097. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.jacc.2016.08.073.

196. TYRRELL, Daniel J.; BHARADWAJ, Manish S.; JORGENSEN, Matthew J.; REGISTER, Thomas C. a MOLINA, Anthony J.A., 2016. Blood cell

respirometry is associated with skeletal and cardiac muscle bioenergetics: Implications for a minimally invasive biomarker of mitochondrial health. *Redox Biology*. Vol. 10, s. 65-77. ISSN 22132317. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.redox.2016.09.009.

197. UK NATIONAL SCREENING COMMITTEE, 2019. *Adult screening programme - dementia*. Online. Dostupné z: https://view-health-screening-recommendations.service.gov.uk/dementia/. [cit. 2025-01-10].

198. ULLAH, Rahat; PARK, Tae Ju; HUANG, Xu a KIM, Myeong Ok, 2021. Abnormal amyloid beta metabolism in systemic abnormalities and Alzheimer's pathology: Insights and therapeutic approaches from periphery. *Ageing Research Reviews*. Vol. 71, s. 101451. ISSN 15681637. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.arr.2021.101451.

199. ULUGUT, Hulya a PIJNENBURG, Yolande A. L., 2023. Frontotemporal dementia: Past, present, and future. *Alzheimer's & Dementia*. Vol. 19, no. 11, s. 5253-5263. ISSN 1552-5260. Dostupné z: https://doi.org/10.1002/alz.13363.

200. VARUGHESE, Joyce T.; BUCHANAN, Susan K. a PITT, Ashley S., 2021. The Role of Voltage-Dependent Anion Channel in Mitochondrial Dysfunction and Human Disease. *Cells*. Vol. 10, no. 7, s. 1737. ISSN 2073-4409. Dostupné z: https://doi.org/10.3390/cells10071737.

201. VEVERA, Jan; FIŠAR, Zdeněk; NEKOVÁŘOVÁ, Tereza; VRABLÍK, Michal; ZLATOHLÁVEK, Lukáš et al., 2016. Statin-Induced Changes in Mitochondrial Respiration in Blood Platelets in Rats and Human With Dyslipidemia. *Physiological Research*. Vol. 65, no. 5, s. 777-788. ISSN 1802-9973. Dostupné z: https://doi.org/10.33549/physiolres.933264.

202. VIDYANTI, Amelia Nur; RAHMAWATI, Fitri; RAHMAN, Rifki Habibi; PRODJOHARDJONO, Astuti a GOFIR, Abdul, 2025. Lifestyle interventions for dementia risk reduction: A review on the role of physical activity and diet in Western and Asian Countries. *The Journal of Prevention of Alzheimer's Disease*. Vol. 12, no. 2, s. 100028. ISSN 22745807. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.tjpad.2024.100028.

203. VUDA, Madhusudanarao a KAMATH, Ashwin, 2016. Drug induced mitochondrial dysfunction: Mechanisms and adverse clinical consequences.

Mitochondrion. Vol. 31, s. 63-74. ISSN 15677249. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.mito.2016.10.005.

204. VZP, 2024. *Včasná diagnostika je klíčová pro zpomalení demence, praktici vloni provedli o třetinu víc testů než v roce 2022*. Online. Dostupné z: https://www.vzp.cz/o-nas/aktuality/vcasna-diagnostika-je-klicova-pro-zpomaleni-demence-praktici-vloni-provedli-o-tretinu-vic-testu-nez-v-roce-2022?utm_source=chatgpt.com. [cit. 2025-02-24].

205. WAHL, Devin; SOLON-BIET, Samantha M.; COGGER, Victoria C.; FONTANA, Luigi; SIMPSON, Stephen J. et al., 2019. Aging, lifestyle and dementia. *Neurobiology of Disease*. Vol. 130, s. 104481. ISSN 09699961. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.nbd.2019.104481.

206. WANG, Li; WU, Qiang; FAN, Zhijia; XIE, Rufeng; WANG, Zhicheng et al., 2017a. Platelet mitochondrial dysfunction and the correlation with human diseases. *Biochemical Society Transactions*. Vol. 45, no. 6, s. 1213-1223. ISSN 0300-5127. Dostupné z: https://doi.org/10.1042/BST20170291.

207. WANG, Ye-Ran; WANG, Qing-Hua; ZHANG, Tao; LIU, Yu-Hui; YAO, Xiu-Qing et al., 2017b. Associations Between Hepatic Functions and Plasma Amyloid-Beta Levels—Implications for the Capacity of Liver in Peripheral Amyloid-Beta Clearance. *Molecular Neurobiology*. Vol. 54, no. 3, s. 2338-2344. ISSN 0893-7648. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/s12035-016-9826-1.

208. WANG, Yi; YANG, Jing; ZHANG, Yu a ZHOU, Jianhua, 2024. Focus on Mitochondrial Respiratory Chain: Potential Therapeutic Target for Chronic Renal Failure. *International Journal of Molecular Sciences*. Vol. 25, no. 2, s. 949. ISSN 1422-0067. Dostupné z: https://doi.org/10.3390/ijms25020949.

209. WHO [WORLD HEALTH ORGANIZATION], 2023. *Dementia*. Online. Dostupné z: https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dementia. [cit. 2025-01-24].

210. XIANG, Yang; BU, Xian-Le; LIU, Yu-Hui; ZHU, Chi; SHEN, Lin-Lin et al., 2015. Physiological amyloid-beta clearance in the periphery and its therapeutic potential for Alzheimer's disease. *Acta Neuropathologica*. Vol. 130, no. 4, s. 487-499. ISSN 0001-6322. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/s00401-015-1477-1.

211. YANG, Tuo; SUN, Yang; LU, Zhengyu; LEAK, Rehana K. a ZHANG, Feng, 2017. The impact of cerebrovascular aging on vascular cognitive impairment and dementia. *Ageing Research Reviews*. Vol. 34, s. 15-29. ISSN 15681637. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.arr.2016.09.007.

212. YE, Chuanzhong; SHU, Xiao Ou; PIERCE, Larry; WEN, Wanqing; COURTNEY, Regina et al., 2010. Mutations in the mitochondrial DNA D-loop region and breast cancer risk. *Breast Cancer Research and Treatment*. Vol. 119, no. 2, s. 431-436. ISSN 0167-6806. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/s10549-009-0397-y.

213. YIN, Fei; SANCHETI, Harsh; PATIL, Ishan a CADENAS, Enrique, 2016. Energy metabolism and inflammation in brain aging and Alzheimer's disease. *Free Radical Biology and Medicine*. Vol. 100, s. 108-122. ISSN 08915849. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.04.200.

214. YOON, Sang-Sun a AHNJO, Sang-Mee, 2012. Mechanisms of Amyloid-β Peptide Clearance: Potential Therapeutic Targets for Alzheimer's Disease. *Biomolecules and Therapeutics*. Vol. 20, no. 3, s. 245-255. ISSN 1976-9148. Dostupné z: https://doi.org/10.4062/biomolther.2012.20.3.245.

215. YUSOFF, Abdul Aziz Mohamed, 2015. Role of mitochondrial DNA mutations in brain tumors. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*. Vol. 11, no. 3, s. 535-544. ISSN 0973-1482. Dostupné z: https://doi.org/10.4103/0973-1482.161925.

216. ZHANG, Chun-Yun; HE, Fang-Fang; SU, Hua; ZHANG, Chun a MENG, Xian-Fang, 2020. Association between chronic kidney disease and Alzheimer's disease: an update. *Metabolic Brain Disease*. Vol. 35, no. 6, s. 883-894. ISSN 0885-7490. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/s11011-020-00561-y.

217. ZHAO, Hainan; YUAN, Hongxia; WANG, Ermin a LIU, Guiyou, 2024. Causal Effects of Kidney Function and Chronic Kidney Disease on Alzheimer's Disease by Analyzing Large-Scale Genome-Wide Association Study Datasets. *Journal of Alzheimer's Disease*. Vol. 102, no. 2, s. 321-328. ISSN 1387-2877. Dostupné z: https://doi.org/10.3233/JAD-240807.

4 Přehled publikační činnosti

4.1 Odborné publikace vztahující se k tématu disertační práce

JEDLIČKA, Jan; KUNC, Radovan a KUNCOVÁ, Jitka, 2021. Mitochondrial Respiration of Human Platelets in Young Adult and Advanced Age – Seahorse or O2k? *Physiological Research*. Vol. 70, no. S3, s. S369-S379. ISSN 1802-9973. Dostupné z: https://doi.org/10.33549/physiolres.934812.

JEDLIČKA, Jan; TŮMA, Zdeněk; RAZAK, Karim; KUNC, Radovan; KALA, Annu et al., 2022. Impact of Aging on Mitochondrial Respiration in Various Organs. *Physiological Research*. Vol. 71, no. Suppl. 2, s. S227-S236. ISSN 1802-9973. Dostupné z: https://doi.org/10.33549/physiolres.934995.

KUNC, Radovan; JEDLIČKA, Jan a KUNCOVÁ, Jitka, 2022. Patofyziologie Alzheimerovy choroby – historie, současnost, kontroverze. *Československá fyziologie*. Roč. 71, č. 1, s. 12-20. ISSN 1210-6313.

KUNC, Radovan; KUČEROVÁ, Hana; SOUKUPOVÁ, Kateřina a LANGMAJER, Marek, 2017. Alzheimerova choroba – úskalí diagnostiky a možnosti terapie. In: *Plzeňský lékařský sborník: Supplementum 87*. Praha: Karolinum, s. 59-64. ISBN 978-80-246-3756-3. ISSN 0139-603X.

4.2 Ostatní odborné publikace

KUNC, Radovan, 2020. *Alzheimerova choroba (přehled) a vliv anticholinergních účinků léčiv na kognitivní funkce u seniorů*. Atestační práce (obor geriatrie). Plzeň: Lékařská fakulta Univerzity Karlovy v Plzni.

KUNC, Radovan, 2022. *Identifikace přechodu geriatrické křehkosti do geriatrické deteriorace*. Atestační práce (obor paliativní medicína). Praha: IPVZ.

4.3 Vybrané přednášky na odborných setkáních a konferencích

KUNC, Radovan, 2018. *Alzheimerova choroba – úskalí diagnostiky a možnosti terapie*. Přednáška – Postgraduální lékařské dny. Plzeň: Šafránkův pavilon. 13.2.2018-15.2.2018.

KUNC, Radovan, 2018. *Geriatrie a gerontologie.* Série přednášek. Ostrava: U3V. 29.10.2018-30.10.2018 a 11.11.2018-12.11.2018.

KUNC, Radovan, 2020. *Anticholinergní účinky léčiv.* Přednáška – Společný workshop mladých geriatrů a mladých praktiků „SPOLUPRÁCE A

COMPLIANCE“. Praha: Nemocnice Milosrdných sester sv. Karla Boromejského. 18.1.2020.

KUNC, Radovan, 2023. *Přechod do geriatrické deteriorace.* Přednáška – 14. Celostátní konference paliativní medicíny. Praha: Clarion Congress hotel. 16.9.2023.

KUNC, Radovan, 2024. *Domácí hospic.* Přednáška – I. Západočeská konference paliativní péče. Plzeň: Střední odborné učiliště elektrotechnické v Plzni. 15.3.2024.

KUNC, Radovan, 2025. *Frailty syndrom s přechodem do geriatrické deteriorace.* Přednáška – II. Západočeská konference paliativní péče. Plzeň: Střední odborné učiliště elektrotechnické v Plzni. 14.3.2025.

5 Přílohy

Přílohy jsou přiložené dle níže uvedeného pořadí.

5.1 Použité testy a dotazníky

Montrealský kognitivní test MoCA-CZ1 [Bartoš et al., 2014]

Montrealský kognitivní test MoCA-CZ2

The Short Physical Performance Battery (SPPB) [Berková et al., 2013]

5.2 Publikované práce autora vztahující se k disertační práci

JEDLIČKA, Jan; KUNC, Radovan a KUNCOVÁ, Jitka, 2021. Mitochondrial Respiration of Human Platelets in Young Adult and Advanced Age – Seahorse or O2k? *Physiological Research*. Vol. 70, no. S3, s. S369-S379. ISSN 1802-9973. Dostupné z: https://doi.org/10.33549/physiolres.934812.

JEDLIČKA, Jan; TŮMA, Zdeněk; RAZAK, Karim; KUNC, Radovan; KALA, Annu et al., 2022. Impact of Aging on Mitochondrial Respiration in Various Organs. *Physiological Research*. Vol. 71, no. Suppl. 2, s. S227-S236. ISSN 1802-9973. Dostupné z: https://doi.org/10.33549/physiolres.934995.

KUNC, Radovan; JEDLIČKA, Jan a KUNCOVÁ, Jitka, 2022. Patofyziologie Alzheimerovy choroby – historie, současnost, kontroverze. *Československá fyziologie*. Roč. 71, č. 1, s. 12-20. ISSN 1210-6313.

Identifikační číslo osoby: _____

Administrátor: _____

MONTREALSKÝ KOGNITIVNÍ TEST MoCA-CZ1

Jméno a příjmení:_____ Datum narození:_____

Datum vyšetření:_____ Dominance (kroužkujte): *1* – pravák, *2* – levák, *3* – ambidexter

Vzdělání (kroužkujte): *1* – ZŠ, *2* – SŠ bez maturity, *3* – SŠ s maturitou, *4* – VŠ Počet let vzdělání: _____

INSTRUKCE	HODNOCENÍ	MoCA skór
ZRAKOVĚ-PROSTOROVÉ A EXEKUTIVNÍ ÚLOHY		
1. Zkrácený test cesty *„Spojte postupně čárou číslice a písmena. Začněte od čísla 1 směrem k A, pak od A ke 2 a tak dále a skončete u E.“*	1 bod náleží správně propojeným číslicím a písmenům 1–A–2–B–3–C–4–D–5–E. Čáry se nesmí křížit. Bod může být přiznán i při chybném propojení, jen když se vyšetřovaný/á sám okamžitě opraví.	____/1
2. Obkreslování krychle *„Okopírujte tuto kresbu co nejpřesněji na volné místo vedle ní.“*	1 bod náleží přesné kopii krychle. Kresba musí být trojrozměrná. Žádné čáry nesmí chybět ani přebývat. Čáry by měly být rovnoběžné, přibližně stejné délky. Lze uznat kresbu kvádru. Pokud kresba nevyhovuje těmto požadavkům, bod se neudělí.	____/1
3. Test kreslení hodin *„Nakreslete hodiny. Na ciferník umístěte všechna čísla a vyznačte čas 11 hodin 10 minut. Snažte se kreslit co nejpřesněji.“*	Kontura _____: 1 bod náleží za ciferník nakreslený jako kruh. Lze uznat drobné odchylky - např. ne zcela přesné spojení kružnice. Čísla _____: 1 bod se přidělí, pokud žádná čísla nechybí ani nepřebývají. Čísla musí být uvedena ve správném pořadí a ve správných kvadrantech ciferníku. Akceptují se i římské číslice. Čísla mohou být umístěna vně kontury kruhu. Ručičky _____: 1 bod náleží za několika podmínek: Musí být zakresleny dvě ručičky ukazující správný čas. Ručičky musí vycházet ze středu ciferníku a poblíž středu ciferníku musí být spojeny. Hodinová ručička musí být zřetelně kratší než minutová.	____/3
4. POJMENOVÁNÍ *„Pojmenujte tato zvířata.“*	Lev _____ Nosorožec _____ Velbloud _____ 1 bod se přidělí za každé správně pojmenované zvíře. Místo ‚velbloud' lze uznat i ‚dromedár'.	____/3
5. PAMĚŤ – vštípení *1. „Nyní vyzkoušíme Vaši paměť. Přečtu Vám seznam slov, která si máte teď zapamatovat a pak si na ně později vzpomenout. Poslouchejte pozorně. Až skončím, snažte si vzpomenout na co nejvíce slov. Na pořadí nezáleží.“* *2. „Přečtu Vám stejný seznam slov ještě jednou. Snažte si zapamatovat co nejvíce slov a poté mi je vyjmenujte, včetně těch, která jste jmenoval/a poprvé.“*	Čtěte rychlostí 1 slovo za sekundu. 1. pokus: TVÁŘ, SAMET, KOSTEL, KOPRETINA, ČERVENÁ, správně vybaveno (body) 2. pokus ***„Na konci testu Vás požádám, abyste si na tato slova znovu vzpomněl/a.“*** Za každé správně vybavené slovo udělte 1 nepovinný bod.	Zde neuděl-ujte žádné body
6. POZORNOST **A. Opakování číslic**		
1. *„Řeknu Vám řadu číslic. Až skončím, opakujte je ve stejném pořadí, v jakém jste je slyšel/a.“*	**2 1 8 5 4** _____ Čtěte rychlostí 1 číslice za sekundu. 1 bod za správné zopakování všech číslic.	____/2
2. *„Nyní Vám řeknu další řadu číslic. Až skončím, opakujte je v opačném pořadí, než jste je slyšel/a.“*	**7 4 2** _____ Čtěte rychlostí 1 číslice za sekundu. 1 bod za správné zopakování všech číslic pozpátku.	

B. Vyťukávání písmene A

„Přečtu Vám řadu písmen. Pokaždé, když řeknu písmeno A, ťukněte rukou o stůl. Když řeknu jiné písmeno, neťukejte.“

F B A C M N A A J K L B A F A K D E A A A J A M O F A A B

Jako chyba se počítá, když testovaný ťukne při jiném písmenu, nebo neťukne při písmenu A. Přidělte 1 bod, pokud testovaný neudělá chybu, nebo se splete pouze 1krát.

____/1

C. Odečítání sedmiček

„Odečtěte od čísla 100 číslo 7 a pak pokračujte v odčítání 7, dokud Vás nezastavím.“

93 _____ **86** _____ **79** _____ **72** _____ **65** _____

Pokud je potřeba, instrukci řekněte ještě 1x.

Počítá se každé správné odečtení 7. Každý odečet se hodnotí odděleně. Skórujte 4–5 správných odečtů = 3 body, 2-3 správných = 2 body, 1 správný = 1 bod, 0 správných = 0 bodů.

____/3

ŘEČ

7. Opakování vět

„Přečtu Vám větu. Vy ji po mně zopakujete přesně tak, jak jsem ji řekl/a.

Pouze vím, že je to Jan, kdo má dnes pomáhat. _____

„Nyní Vám přečtu další větu. Opakujte ji po mně přesně tak, jak jsem ji řekl/a.“

Když jsou v místnosti psi, kočka se vždy schová pod gauč. _____

1 bod za každou správně opakovanou větu. Odpověď musí být přesná. Nelze uznat vynechání, nahrazení nebo přidání slova.

____/2

8. Slovní produkce na počáteční písmeno „K“

„Vaším úkolem bude vyjmenovat co nejvíce slov, která začínají určitým písmenem. Můžete vyjmenovávat jakákoliv slova. Nesmíte však říkat vlastní jména a názvy (např. Barbora, Bratislava) a slova, která se liší pouze příponami (např. malba, malíř, malovat). Po 1 minutě Vás zastavím. Jste připraven/a? (pauza) *Vyjmenujte co nejvíce slov, která začínají písmenem **K**. Teď.“* (Po uplynutí 60 sekund.) *„Stop.“*

Počet všech slov: _____ **Počet správných slov:** _____

Slova můžete zaznamenávat na zadní stranu listu pro pacienta.

Přidělte 1 bod, pokud vyšetřovaný vyjmenuje 11 a více správných slov během 1 minuty.

____/1

9. ABSTRAKCE

Nácvik

„Řekněte mi, co mají společného

pomeranč a banán.“

Po špatné odpovědi se zeptejte max. 1x : *„Co mají ještě jiného společného?“* Pokud vyšetřovaný neodpoví správně, řekněte: *„Ano, ale obojí je také ovoce.“*

Správná odpověď (obojí je ovoce) se neboduje.

1. ___

„Nyní mi řekněte, co mají společného

vlak a bicykl.“

1 bod za odpověď: dopravní prostředky, způsoby cestování, oběma můžete jet na výlet. Jiné odpovědi jsou špatně.

2. ___

„Nyní mi řekněte, co mají společného

hodinky a pravítko.“

1 bod za odpověď: nástroje na měření, používají se k měření. Jiné odpovědi jsou špatně.

____/2

10. PAMĚŤ – oddálené vybavení

Přidělte 1 bod za každé správně vybavené slovo **pouze bez nápovědy.**

„Před několika minutami jsem Vám přečetl/a seznam slov. Řekněte mi co nejvíce slov, která si z něj pamatujete.“

	TVÁŘ	SAMET	KOSTEL	KOPRETINA	ČERVENÁ	vybaveno slov
Bez nápovědy						

____/5

Oddálené vybavení bez nápovědy lze doplnit vybavením s nápovědou. Ke každému slovu, které vyšetřovaný nevybavil, poskytněte kategoriální nápovědu. Pokud ani tak slovo nevybaví, poskytněte nápovědu výběrem ze 3 možností.

vybaveno slov

„V seznamu, který jsem Vám četl/a, byl/a (doplňte kateg. nápovědu)*...?“*	Kategoriální nápověda	část těla –	druh tkaniny –	typ stavby –	druh květiny –	barva –	
„ Které z následujících slov tam podle Vás bylo (nápověda výběrem)*...?“*	Nápověda výběrem	nos tvář ___ ruka	pytlovina bavlna samet ___	kostel ___ škola nemocnice	růže kopretina ___ tulipán	červená ___ modrá zelená	

Nepřidělujte žádný bod do skóru MoCA!

11. ORIENTACE

„Kolikátého je dnes?“

datum _____ **rok** _____

měsíc _____ **den v týdnu** _____

„Nyní mi řekněte přesný název tohoto místa a město, ve kterém jsme.“

místo _____ **město** _____

Pokud zkoušený neuvede celou odpověď, zeptáme se doplňujícími otázkami. *„Řekněte mi, jaké je dnes přesné datum, měsíc, rok, den v týdnu?“* Nelze uznat odchylku 1 dne.

1 bod za každou správnou odpověď. Odpovědi musí být přesné - přesný název nemocnice či kliniky.

____/6

Převod do češtiny a graf. úprava: Doc. MUDr. A. Bartoš, PhD, Bc. H. Orlíková, 2012.
Původní zdroj: MOCA 7.1, © Z. Nasredine MD, www.mocatest.org.

+1b těm, kteří mají 10-12 let vzdělání,
+2b těm, kteří mají 4-9let vzdělání:
norma ≥26/30

CELKEM

bod(y) za vzdělání

____/30

ZÁZNAMOVÝ ARCH SLOVNÍ PRODUKCE

počet	Slovo na K	CHYBY
1		
2		
3		
4		
5		
6		
7		
8		
9		
10		
11		
12		
13		
14		
15		
16		
17		
18		
19		
20		

počet	Slovo na K	CHYBY
21		
22		
23		
24		
25		
26		
27		
28		
29		
30		
31		
32		
33		
34		
35		
36		

Celkový počet slov	
Opakování	minus
Mimo podmínky	minus
Celkem správně	=

Poznámka: opakovaná slova označte vpravo od slova „OP“ a škrtněte slovo a číslo vlevo (např. ~~*15 kyvadlo OP*~~), slova mimo podmínky označte vpravo od slova „MP“ a škrtněte slovo a číslo vlevo (např. ~~*11 Kanada MP*~~).

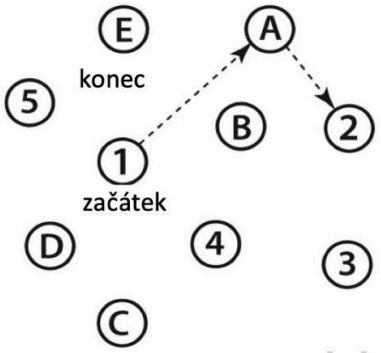
Převod do češtiny a grafické zpracování tréninkové verze: Doc. MUDr. Aleš BARTOŠ, Ph.D., Bc. Hana ORLÍKOVÁ. Ke volnému stažení z www.nudz.cz/adcentrum. Převod a úpravy byly schváleny kontrolou zpětného překladu do angličtiny původním autorem Dr. Nasreddine v říjnu 2012.

Zdroj původní české verze: Bartoš, Orlíková, Raisová, Řípová. Česká tréninková verze Montrealského kognitivního testu (MoCA-CZ1) k časné detekci Alzheimerovy nemoci. Cesk Slov Neurol N 2014; 77/ 110(5): 587–595
Reban J. Montrealský kognitivní test (MoCA): přínos k diagnostice predmencí.Čes Ger Revue 2006; 4: 224-229.

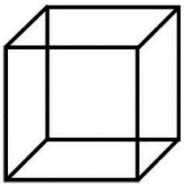
Původní zdroj: Nasreddine ZS, Phillips NA, Bedirian, V, Charboneau S, Whitehead V, Collin I et al. The Montreal Cognitive Assessment, MoCA: a brief screening tool for mild cognitive impairment. J. Am. Geriatr Soc 2005; 53(4): 695-699.

LIST PRO VYŠETŘOVANÉHO

Test cesty

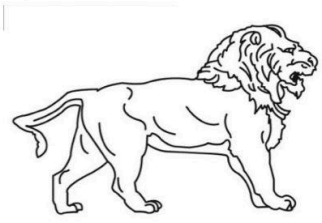


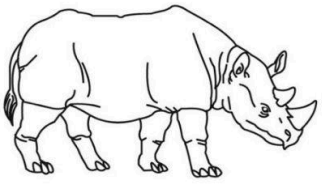
Okopírujte krychli.

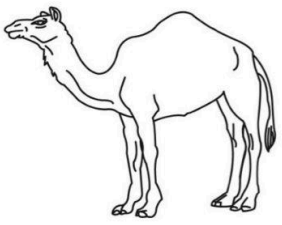


Nakreslete hodiny, které ukazují jedenáct hodin deset minut.

Pojmenování







Identifikační číslo osoby:_____

Administrátor: :_____

MONTREALSKÝ KOGNITIVNÍ TEST MoCA-CZ2

Jméno a příjmení:_____ Datum narození:_____

Datum vyšetření:_____ Dominance (kroužkujte): *1* – pravák, *2* – levák, *3* – ambidexter

Vzdělání (kroužkujte): *1* – ZŠ, *2* – SŠ bez maturity, *3* – SŠ s maturitou, *4* – VŠ Počet let: _____

INSTRUKCE	HODNOCENÍ	MoCA skór
ZRAKOVĚ-PROSTOROVÉ A EXEKUTIVNÍ ÚLOHY		
1. Zkrácený test cesty *„Spojte postupně čárou číslice a písmena. Začněte od čísla 1 směrem k A, pak od A ke 2 a tak dále a skončete u E.“*	1 bod náleží správně propojeným číslicím a písmenům 1–A–2–B–3–C–4–D–5–E. Čáry se nesmí křížit. Bod může být přiznán i při chybném propojení, pokud dojde k okamžité opravě.	____/1
2. Obkreslování kvádru *„Okopírujte tuto kresbu co nejpřesněji na volné místo vedle ní.“*	1 bod náleží přesné kopii kvádru. Kresba musí být trojrozměrná. Žádné čáry nesmí chybět ani přebývat. Čáry by měly být rovnoběžné. Objekt musí být jasně kvádr (např. kratší svislé strany nesmí mít více než ¾ délky delší horizontální strany). Pokud kresba nevyhovuje těmto požadavkům, bod se neudělí.	____/1
3. Test kreslení hodin *„Nakreslete hodiny. Na ciferník umístěte všechna čísla a vyznačte čas 4 hodiny 5 minut.“*	Kontura _____: 1 bod náleží za ciferník nakreslený jako kruh. Lze uznat drobné odchylky - např. ne zcela přesné spojení kružnice. Čísla _____: 1 bod se přidělí, pokud žádná čísla nechybí ani nepřebývají. Čísla musí být uvedena ve správném pořadí a ve správných kvadrantech ciferníku. Akceptují se i římské číslice. Čísla mohou být umístěna vně kontury kruhu. Ručičky _____: 1 bod náleží za několika podmínek: Musí být zakresleny dvě ručičky ukazující správný čas. Ručičky musí vycházet ze středu ciferníku a poblíž středu ciferníku musí být spojeny. Hodinová ručička musí být zřetelně kratší než minutová.	____/3
4. POJMENOVÁNÍ *„Pojmenujte tato zvířata.“*	Žirafa _____ Medvěd _____ Hroch _____ 1 bod se přidělí za každé správně pojmenované zvíře. Lze uznat konkrétní druh medvěda.	____/3
5. PAMĚŤ - vštípení *1. „Nyní vyzkoušíme Vaši paměť. Přečtu Vám seznam slov, která si máte teď zapamatovat a pak si na ně později vzpomenout. Poslouchejte pozorně. Až skončím, snažte si vzpomenout na co nejvíce slov. Na pořadí nezáleží.“* *2. „Přečtu Vám stejný seznam slov ještě jednou. Snažte si zapamatovat co nejvíce slov a poté mi je vyjmenujte, včetně těch, která jste jmenoval/a poprvé.“*	Čtěte rychlostí 1 slovo za sekundu. 1. pokus: ČLUN _____ MERUŇKA _____ KYTARA _____ STŮL _____ ZELENÁ _____ správně vybaveno (body) _____ 2. pokus: ČLUN _____ MERUŇKA _____ KYTARA _____ STŮL _____ ZELENÁ _____ správně vybaveno (body) _____ ***„Na konci testu Vás požádám, abyste si na tato slova znovu vzpomněl/a.“*** Za každé správně vybavené slovo udělte 1 nepovinný bod.	Zde neudělujte žádné body
6. POZORNOST **A. Opakování číslic** ***1.*** *„Řeknu Vám řadu číslic. Až skončím, opakujte je ve stejném pořadí, v jakém jste je slyšel/a.“* Čtěte rychlostí 1 číslice za sekundu.	**3 2 9 6 5** _____ 1 bod za správné zopakování všech číslic.	____/2
2. *„Nyní Vám řeknu další řadu číslic. Až skončím, opakujte je v opačném pořadí, než jste je slyšel/a.“* Čtěte rychlostí 1 číslice za sekundu.	**8 5 2** _____ 1 bod za správné zopakování všech číslic pozpátku.	

B. Vyťukávání písmene A

„Přečtu Vám řadu písmen. Pokaždé, když řeknu písmeno A, ťukněte rukou o stůl. Když řeknu jiné písmeno, neťukejte.“

F B A C M N A A J K L B A F A K D E A A A J A M O F A A B

Jako chyba se počítá, když testovaný ťukne při jiném písmenu, nebo neťukne při písmenu A. Přidělte 1 bod, pokud testovaný neudělá chybu, nebo se splete pouze 1krát. ____/1

C. Odečítání sedmiček

„Odečtěte od čísla 90 číslo 7 a pak pokračujte v odčítání 7, dokud Vás nezastavím.“

83 _____ 76 _____ 69 _____ 62 _____ 55 _____

Pokud je potřeba, instrukci řekněte ještě 1x.

Počítá se každé správné odečtení 7. Každý odečet se hodnotí odděleně. Skórujte 4–5 správných odečtů = 3 body, 2-3 správných = 2 body, 1 správný = 1 bod, 0 správných = 0 bodů. ____/3

ŘEČ

7. Opakování vět

„Přečtu Vám větu. Vy ji po mně zopakujete přesně tak, jak jsem ji řekl/a.“

Pták může narazit do zavřených oken, když je tma a větrno. _____

„Nyní Vám přečtu další větu. Opakujte ji po mně přesně tak, jak jsem ji řekl/a.“

Starostlivá babička poslala potraviny před více než týdnem. _____

1 bod za každou správně opakovanou větu. Odpověď musí být přesná. Nelze uznat vynechání, nahrazení nebo přidání slova. ____/2

8. Slovní produkce na počáteční písmeno „P“

„Vaším úkolem bude vyjmenovat co nejvíce slov, která začínají určitým písmenem. Můžete vyjmenovávat jakákoliv slova. Nesmíte však říkat vlastní jména a názvy (např. Barbora, Bratislava), čísla a slova, která se liší pouze příponami (např. malba, malíř, malovat). Po 1 minutě Vás zastavím. Jste připraven/a? (pauza) *Vyjmenujte co nejvíce slov, která začínají písmenem **P**. Teď.“* (Po uplynutí 60 sekund.) *„Stop.“*

Počet všech slov: ____ **Počet správných slov:** _____

Slova můžete zaznamenávat na zadní stranu listu pro pacienta.

Přidělte 1 bod, pokud vyšetřovaný vyjmenuje 11 a více slov během 1 minuty. ____/1

9. ABSTRAKCE

Nácvik

„Řekněte mi, co mají společného
mrkev a brambora.“

Po špatné odpovědi se zeptejte max. 1x : *„Co mají ještě jiného společného?“* Pokud vyšetřovaný neodpoví správně, řekněte: *„Ano, ale obojí je také zelenina.“*

Správná odpověď (obojí je zelenina) se neboduje.

1. ____

„Nyní mi řekněte, co mají společného
diamant a rubín.“

1 bod za odpověď: drahokamy. Jiné odpovědi jsou špatně.

2. ____

„Nyní mi řekněte, co mají společného
dělo a puška.“

1 bod za odpověď: zbraně, používají se pro zabíjení lidí, používají se ve válce. Jiné odpovědi jsou špatně. ____/2

10. PAMĚŤ – oddálené vybavení

Přidělte 1 bod za každé správně vybavené slovo **pouze bez nápovědy**

„Před několika minutami jsem Vám přečetl/a seznam slov. Řekněte mi co nejvíce slov, která si z něj pamatujete.“

	ČLUN	MERUŇKA	KYTARA	STŮL	ZELENÁ	vybaveno slov
Bez nápovědy						

____/5

Oddálené vybavení bez nápovědy lze doplnit vybavením s nápovědou. Ke každému slovu, které vyšetřovaný nevybavil, poskytněte kategoriální nápovědu. Pokud ani tak slovo nevybaví, poskytněte nápovědu výběrem ze 3 možností.

							vybaveno slov
„V seznamu, který jsem Vám četl/a, byl/a (doplňte kateg. nápovědu)...?“	Kategoriální nápověda	dopravní prostředek _	druh ovoce _	hudební nástroj _	kus nábytku _	barva _	
„ Které z následujících slov tam podle Vás bylo (nápověda výběrem)...?“	Nápověda výběrem	loď člun ____ auto	hruška jablko meruňka ____	kytara ____ harfa housle	židle stůl ____ postel	zelená ____ žlutá černá	

Nepřidělujte žádný bod do skóru MoCA!

11. ORIENTACE

„Kolikátého je dnes?“

datum _____ **rok** _____

měsíc _____ **den v týdnu** _____

„Nyní mi řekněte přesný název tohoto místa a město, ve kterém jsme.“

místo _____ **město** _____

Pokud zkoušený neuvede celou odpověď, zeptáme se doplňujícími otázkami. *„Řekněte mi, jaké je dnes přesné datum, měsíc, rok, den v týdnu?“* Nelze uznat odchylku 1 dne.

1 bod za každou správnou odpověď. Odpovědi musí být přesné - přesný název nemocnice či kliniky. ____/6

Převod do češtiny a graf. úprava: Doc. MUDr. A. Bartoš, PhD, Bc. H. Orlíková, 2012.
Původní zdroj: MOCA 7.2, © Z. Nasredine MD, www.mocatest.org.

+1b těm, kteří mají 10-12 let vzdělání,
+2b těm, kteří mají 4-9let vzdělání;

CELKEM bod(y) za vzdělání ____/30

ZÁZNAMOVÝ ARCH SLOVNÍ PRODUKCE

počet	Slovo na P	CHYBY
1		
2		
3		
4		
5		
6		
7		
8		
9		
10		
11		
12		
13		
14		
15		
16		
17		
18		
19		
20		

počet	Slovo na P	CHYBY
21		
22		
23		
24		
25		
26		
27		
28		
29		
30		
31		
32		
33		
34		
35		
36		

Celkový počet slov	
Opakování	minus
Mimo podmínky	minus
Celkem správně	=

Poznámka: opakovaná slova označte vpravo od slova „OP“ a škrtněte slovo a číslo vlevo (např. ~~*15 prut OP*~~), slova mimo podmínky označte vpravo od slova „MP“ a škrtněte slovo a číslo vlevo (např. ~~*11 Praha MP*~~).

Převod do češtiny a grafické zpracování tréninkové verze: Doc. MUDr. Aleš BARTOŠ, Ph.D., Bc. Hana ORLÍKOVÁ. Ke volnému stažení z www.nudz.cz/adcentrum. Převod a úpravy byly schváleny kontrolou zpětného překladu do angličtiny původním autorem Dr. Nasreddine v říjnu 2012.

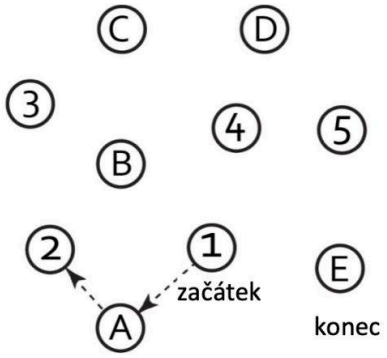
Zdroj původní české verze: Bartoš, Orlíková, Raisová, Řípová. Česká tréninková verze Montrealského kognitivního testu (MoCA-CZ1) k časné detekci Alzheimerovy nemoci. Cesk Slov Neurol N 2014; 77/ 110(5): 587–595
Reban J. Montrealský kognitivní test (MoCA): přínos k diagnostice predmencí.Čes Ger Revue 2006; 4: 224-229.

Původní zdroj: Nasreddine ZS, Phillips NA, Bedirian, V, Charboneau S, Whitehead V, Collin I et al. The Montreal Cognitive Assessment, MoCA: a brief screening tool for mild cognitive impairment. J. Am. Geriatr Soc 2005; 53(4): 695-699.

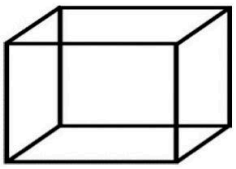
Příjmení nebo identifikační číslo osoby: _____

LIST PRO VYŠETŘOVANÉHO

Test cesty

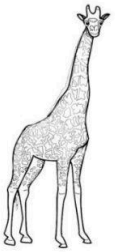


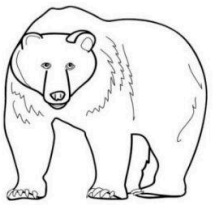
Okopírujte kvádr.

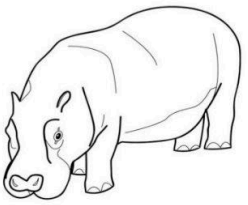


Nakreslete hodiny, které ukazují čtyři hodiny pět minut.

Pojmenování







Krátká baterie pro hodnocení fyzické zdatnosti seniorů
Short Physical Performance Battery (SPPB)

Položky		Bodové skóre
A. Testy rovnováhy		
1. stoj spojný (nohy vedle sebe)	méně než 10 sekund	0
	po dobu 10 sekund	1
2. stoj v semitandemové pozici (pata jedné nohy vedle palce na druhé noze)	méně než 10 sekund	0
	po dobu 10 sekund	1
3. tandemová pozice vestoje (pata přední nohy se dotýká prstů druhé nohy)	< 3 s	0
	3–9,99 s	1
	≥ 10 s	2

B. Test rychlosti chůze

Měření doby chůze na vzdálenost 4 m obvyklým způsobem (započítáme rychlejší čas ze 2 pokusů).

chůze neschopen, nebo s dopomocí druhé osoby	0
> 8,7 s	1
6,21–8,70 s	2
4,82–6,20 s	3
< 4,82 s	4

C. Test vstávání ze židle

Pacient sedí na židli, zkříží si ruce na hrudi a vstává bez pomoci rukou. Měříme čas v sekundách nutný k provedení 5 postavení ze sedu do vzpřímeného stoje co nejrychleji bez pomoci rukou.

> 60 s nebo neschopen	0
> 16,7 s	1
13,70–16,69 s	2
11,20–13,69 s	3
≤ 11,19 s	4

Celkové skóre

Celkové hodnocení:

10–12 bodů	dobrá fyzická zdatnost
7–9 bodů	snížená fyzická zdatnost, nutné klinické hodnocení a intervence, „pre-frailty“
≤ 6 bodů	křehký senior, vysoké riziko budoucí nesoběstačnosti

Physiol. Res. 70 (Suppl. 3): S369-S379, 2021 *https://doi.org/10.33549/physiolres.934812*

Mitochondrial Respiration of Human Platelets in Young Adult and Advanced Age – Seahorse or O2k?

Jan JEDLIČKA[1,2*], Radovan KUNC[3,4*], Jitka KUNCOVÁ[1,2]
** These authors contributed equally to this work.*

[1]Institute of Physiology, Faculty of Medicine in Plzeň, Charles University, Plzeň, Czech Republic, [2]Biomedical Centre, Faculty of Medicine in Plzeň, Charles University, Plzeň, Czech Republic, [3]Institute of Social Medicine, Faculty of Medicine in Plzeň, Charles University, Plzeň, Czech Republic, [4]Hospice of St. Lazar, Plzeň, Czech Republic

Received April 19, 2021
Accepted October 12, 2021

Summary

The objective of the present study was to evaluate platelet mitochondrial oxygen consumption using high-resolution respirometry (HRR) and metabolic flux analysis (MFA) and to verify the effect of advanced age on these parameters. HRR was used to analyze permeabilized and intact platelets, MFA to measure oxygen consumption rates (OCR), extracellular acidification rates (ECAR) and ATP production rate in intact fixed platelets. Two groups of healthy volunteers were included in the study: YOUNG (20-42 years, n=44) and older adults (OLD; 70-89 years; n=15). Compared to YOUNG donors, platelets from group OLD participants displayed significantly lower values of oxygen consumption in the Complex II-linked phosphorylating and uncoupled states and the Complex IV activity in HRR protocols for permeabilized cells and significantly lower resting and uncoupled respirations in intact cells when analyzed by both methods. In addition, mitochondrial ATP production rate was also significantly lower in platelets isolated from older adults. Variables measured by both methods from the same bloods correlated significantly, nevertheless those acquired by MFA were higher than those measured using HRR. In conclusion, the study verifies compromised mitochondrial respiration and oxidative ATP production in the platelets of aged persons and documents good compatibility of the two most widely used methods for determining the global performance of the electron-transporting system, i.e. HRR and MFA.

Key words

Platelets • Mitochondrial respiration • Aging • High resolution respirometry • Metabolic flux analysis

Corresponding author

J. Kuncová, Institute of Physiology, Faculty of Medicine in Plzeň, Charles University, Alej Svobody 76, 323 00, Plzeň, Czech Republic. E-mail: jitka.kuncova@lfp.cuni.cz

Introduction

Mitochondrial dysfunction is associated with a wide variety of serious cardiovascular, neurodegenerative or metabolic diseases and at least in some of them, mitochondria are regarded as a key player in the onset or progress of the disease (Javadov *et al.* 2020). It is also known that many mitochondrial functions decrease with age which might contribute to frailty, sarcopenia, neurodegenerative and metabolic disorders frequently associated with the advanced age (Alexiou *et al.* 2018, Joseph *et al.* 2012). Analysis of mitochondrial oxygen consumption and energy production requires fresh samples of the affected tissues obtained by invasive tissue biopsies or use of animal models of the diseases that have frequently only limited translational potential (Leenaars *et al.* 2019). Over the last decade, a number of studies have documented that the assessment of bioenergetics of peripheral blood cells might reflect mitochondrial dysfunction in metabolically active tissues (Petrus *et al.* 2019).

Among blood cells equipped with mitochondria, platelets represent an easily accessible and relatively homogenous pool of cells suitable for evaluation of systemic mitochondrial function (Schapira 1993, Tyrrell

PHYSIOLOGICAL RESEARCH • ISSN 1802-9973 (online) - an open access article under the CC BY-NC-ND 4.0 license
© 2021 Institute of Physiology of the Czech Academy of Sciences, Prague, Czech Republic
Fax +420 241 062 164, e-mail: physres@fgu.cas.cz, www.biomed.cas.cz/physiolres

et al. 2014, Tyrrell *et al.* 2016). Platelets are anucleate cells circulating in the blood and playing an important role in all steps of hemostasis, i.e. vasoconstriction, platelet plug formation, blood coagulation, and tissue repair. However, platelets seem to be involved in many processes beyond the hemostasis including inflammation, immunoregulation and probably also pathogenesis of the diseases having serious impact on overall body homeostasis, e.g. neurodegenerative or cardiovascular disorders (Melchinger *et al.* 2019, Yu *et al.* 2020).

The aim of this study was to compare two methods widely used to evaluate mitochondrial respiration in platelets: high resolution respirometry (HRR) based on polarographic detection of oxygen content in analyzed samples (Oxygraph O2k, Oroboros Instruments, Innsbruck, Austria) allowing the complex study of intact or permeabilized cells and metabolic flux analysis (MFA) with the Seahorse bioanalyzer XFp (Agilent, Santa Clara, CA, USA) using small numbers of cells to analyze not only oxygen consumption rate (OCR), but also extracellular acidification rate (ECAR) attributed to glycolytic processes. To verify the effect of aging on platelet mitochondrial function, we included in the study two groups of healthy donors free of any acute disease and selected chronic diseases (diabetes mellitus, chronic heart failure, dysthyroidism, depression, cognitive disorder, cancer, coagulopathy, chronic inflammatory disease) taking 3 selected medications at the maximum and having basic blood parameters within the normal range at the ages 70 to 89 years and 20 to 42 years.

Materials and Methods

Solutions and chemicals

The solutions and media used in analyses contained (in mmol/l): MIR05 respiration medium: EGTA 0.5, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 3, potassium lactobionate 60, taurine 20, KH_2PO_4 10, HEPES 20, sucrose 110, fatty acid free bovine serum albumin 1 g/l, pH 7.0 (Pesta and Gnaiger 2012); PBSG medium: $Na_2HPO_4 \cdot 7H_20$ 7.5, $NaH_2PO_4 \cdot H_20$ 2.5, NaCl 137, KCl 2.7, glucose 10; ATP rate assay medium: Seahorse XF DMEM Medium® supplemented with glucose 5.5 , glutamine 4, pyruvate 1, pH 7.4; procaine solution: procaine hydrochloride 86 and NaCl 34. If not stated otherwise, chemicals were from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). All chemicals were of analytical grade.

Participants

Self-sufficient volunteers without cognitive deficit aged 70 to 89 years (OLD; n=76) were recruited from the University of the Third Age at the Faculty of Medicine in Pilsen, Charles University, healthy relatives of the staff of the laboratory and friends. Fresh blood from younger blood donors (age 20 to 42 years; YOUNG; n=44) was obtained from the Transfusion Department of the Faculty Hospital in Pilsen or from the staff of the laboratory.

Medical history was collected from each participant including the use of medication. All younger participants declared no history of acute or chronic disease and had no medications.

In all participants, basic hematologic parameters were determined by standard laboratory methods (white blood cell count (WBC), red blood cell count (RBC), hemoglobin concentration in the blood (Hb), platelet count (PLT)).

In the group of older adults, basic biochemical and hematological screening was required and all participants underwent cognitive testing using Montreal Cognitive Assessment (MoCA) test to exclude cognitive impairment and Short Physical Performance Battery (SPPB) test to evaluate their physical proficiency. All seniors evaluated themselves as self-sufficient and active persons. Out of 76 volunteers, only 15 could be included in the results of this study: Only seven participants stated no medication and no important medical history (1 of them was then excluded on the basis of biochemical symptoms of acute inflammatory disease), six volunteers took vitamin D, calcium and magnesium for osteoporosis, three atorvastatine at a dose not affecting platelet mitochondrial respiration in humans (Vevera *et al.* 2016), two were on therapy with proton pump inhibitors, 2 used inhibitors of angiotensin I converting enzyme, one participant was treated with β_1-adrenergic antagonist, one inhaled

β_2-adrenergic agonist and one took a low dose corticosteroid medication for the history of rheumatic disease one year ago. All participants with a history of hyper- or hypothyroidism, diabetes, heart failure, ischemic heart disease, depressive disorder, cognitive disorder, inflammatory disease in recent history, history of thrombosis or embolism or on combined medication with more than three drugs were excluded from the study. Scores of MoCA and SPPB tests in the OLD group verified good cognition and self-sufficiency. As expected, RBC and Hb were significantly higher in the YOUNG

group due to unequal distribution of males and females in both groups. Characteristic of the study participants is shown in Table 1.

The study was approved by the Joint Ethics Committee of the Faculty of Medicine and Faculty Hospital in Pilsen and it was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki. Written consent was obtained from all subjects.

Table 1. Characteristic of the study participants.

	YOUNG	OLD	p
N	44	15	
Male/Female	27/17	3/12	
Age	30.7 ± 6.2	76 ± 5	<0.01
Medications	0	6 – 0 6 – vitamin D + calcium, magnesium 3 – atorvastatin 10 mg/day 2 – proton pump inhibitors 2 – ACE inhibitor 1 – β_1-adrenergic antagonist 1 – β_2-adrenergic agonist inhalation 1 – methylprednisolone 2 mg/day	
WBC	6.3 ± 1.1	7.4 ± 3.0	n.s.
RBC	5.2 ± 0.2	4.6 ± 0.4	<0.01
Hb	151 ± 9	138 ± 9	<0.01
PLT	224 ± 41	278 ± 90	n.s.
GLC	n.d.	5.3 ± 1.0	
CRP	n.d.	1.34 ± 0.57	
SPPB	n.d.	11.8 ± 0.4	
MoCA	n.d.	27.2 ± 2.1	

WBC=white blood cell count ($\times 10^9$/l), RBC=red blood cell count ($\times 10^{12}$/l), Hb=hemoglobin concentration in the blood (g/l); PLT=platelet count ($\times 10^9$/l); GLC=blood glucose concentration (mmol/l); CRP=C-reactive protein concentration in the plasma (mg/l); SPPB=Short Physical Performance Battery test (maximum score 12); MoCA=Montreal Cognitive Assessment test (maximum score 30); n.d.=not determined; n.s.=not significant.

Isolation of platelets

Platelets were isolated by differential centrifugation of fresh peripheral venous blood samples (27 ml per person) with EDTA as anticoagulant (Vacuette® blood collection tubes – Dialab, Prague, Czech Republic). Whole blood was mixed with prostaglandin E_1 (62.5 ng/ml) to prevent the activation of platelets during the procedure. Platelet-rich plasma (PRP) was obtained by centrifugation at 300× g for 20 min at 25 °C with no brake. PRP was transferred to the new tubes, mixed with phosphate buffered saline (PBS) at a 1:1 ratio and then centrifuged at 1500× g for 10 min at 25 °C. Supernatants were discarded and the platelet pellets were resuspended in the final media: in MIR05 to measure mitochondrial oxygen consumption in permeabilized platelets and in PBSG to evaluate oxygen consumption in intact platelets. Samples of platelet suspensions were washed for 10 min in the procaine solution to lyse the red blood cells and counted in Bürker's chamber. Final platelet count was adjusted to 150-350$\times 10^9$/l.

Evaluation of mitochondrial respiration using high-resolution respirometry (HRR; O2k)

Intact platelets

In the preliminary experiments, the intact platelets were tested in two media: ATP rate assay medium and PBSG. No significant differences were found in platelet oxygen consumption rates between the two media (data not shown) and the intact platelets were then analyzed in PBSG medium at 37 °C. After equilibration of the medium with atmospheric air and subsequent air calibration, the oxygraph chambers were filled with the samples containing platelet suspensions in

PBSG. The following respiratory states were determined: routine respiration (ROUT) as endogenous basal oxygen consumption dependent on intracellularly available substrates; leak respiration (LEAK) as oxygen consumption determined after administration of ATP-synthase inhibitor oligomycin (Omy; 2 µg/ml) essential for compensation for the proton leakage; capacity of the electron-transporting system (ETSC) as an uncoupled respiration after titration with the protonophore carbonyl cyanide p-trifluoromethoxy-phenylhydrazone (FCCP; 0.5 µmol/l titrations); residual oxygen consumption (ROX) after addition of 0.5 µmol/l rotenone (Rot) and 2.5 µg/ml antimycin A (Ama). A representative graph of an experiment in intact cells is shown in Figure 1A.

Permeabilized platelets (HRR, O2k)

Permeabilized platelets were evaluated in the MIR05 medium at 37 °C using the following substrate-uncoupler-inhibitor-titration protocol (SUIT; Pesta and Gnaiger 2012). After stabilization of the resting respiration, digitonin (dig; 1 µg/10^8 platelets) was titrated to permeabilize the platelet membrane and then malate (0.1 mmol/l) and palmitoyl-L-carnitine (Pcar; 0.04 mmol/l) were added to induce non-phosphorylating leak state when metabolism of fatty acids is activated (LEAK-FAO). Then, active phosphorylating respiration was induced by 5 mmol/l adenosine diphosphate (D; OXPHOS-FAO) and 10 µmol/l cytochrome c (c) was added to check the integrity of the outer mitochondrial membrane. Glutamate (G; 10 mmol/l) and pyruvate (P; 5 mmol/l) were injected as substrates providing electrons to Complex I (OXPHOS-FAO+I), succinate (S; 50 mmol/l) to stimulate Complex II (OXPHOS-FAO+I+II), oligomycin (2 µg/ml) to induce the leak state (LEAK-OMY); FCCP titrations (0.5 µmol/l) were used to uncouple phosphorylation and electron transport and to determine the uncoupled state ETSC-FAO+I+II. Complex I inhibitor rotenone (0.5 µmol/l) was then added to induce ETSC-II and antimycin A (2.5 µg/ml) to inhibit Complex III and measure the state ROX. N,N,N′,N′-tetramethyl-p-phenylenediamine (TMPD; 0.5 mmol/l) in the presence of ascorbate (Asc; 2 mmol/l) was injected to measure the uncoupled capacity of the Complex IV (CIV) that was determined after subtracting the oxygen consumption after administration of sodium azide (Azd; 100 mmol/l), the Complex IV inhibitor. All respiratory states were corrected for ROX.

A sample graph of an experiment in permeabilized cells is shown in Figure 1B.

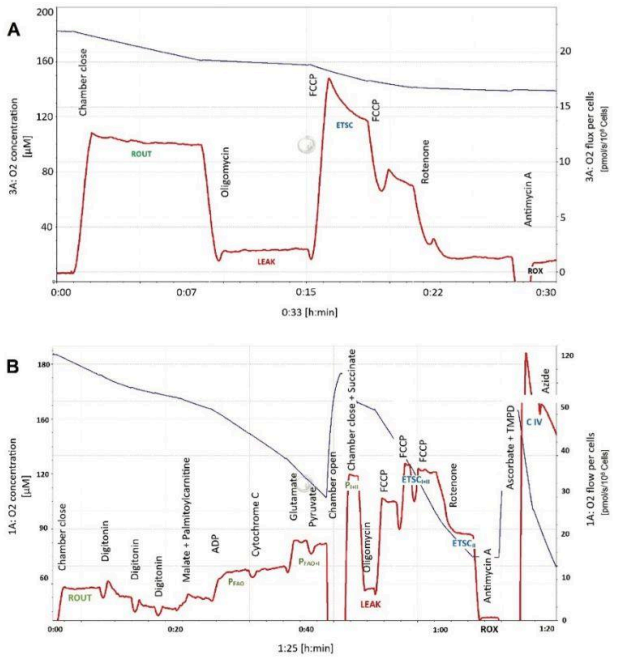


Fig. 1. A representative graph of an experiment in intact (**A**) and permeabilized platelets (**B**). Red line – oxygen consumption rate, blue line – oxygen concentration in the oxygraph chamber. ROUT=routine respiration, ETSC=capacity of the electron-transporting system, P=OXPHOS, active phosphorylating respiration with palmitoyl-L-carnitine (FAO), substrates providing electrons to Complex I (I) and succinate (I+II), $ETSC_{II}$ – electron-transporting system capacity after inhibition of Complex I by rotenone, CIV=uncoupled respiratory capacity of Complex IV. For the concentrations of substrates, inhibitors and uncoupler utilized and precise definition of respiratory states, see Methods.

Evaluation of mitochondrial respiration using metabolic flux analysis (MFA; Seahorse XFp)

Simultaneously with determination of oxygen consumption by HRR, platelets (0.8-1.2×10^7 cells per well) were plated on Cell-Tak coated (Corning® Cell-Tak™ Cell and Tissue Adhesive, Corning, NY, USA) 8 well format XFp plates in the ATP rate assay medium. ATP-rate Real-Time assay (Agilent, Santa Clara, CA, USA) was performed according the manufacturer's instructions. Briefly, five values of basal oxygen consumption rate were measured to determine the state Basal OCR, then oligomycin (1.0 µmol/l) was injected to measure Leak OCR and rotenone (0.5 µmol/l) + antimycin A (0.5 µmol/l) to define ROX OCR. Final values were corrected for ROX. ATP glycolytic and mitochondrial production rates (ATPglyco and ATPmito, respectively) were determined using Seahorse XF Real-Time ATP rate Assay Report (Agilent, Santa Clara, CA, USA). A representative graph of an experiment showing OCR and ECAR is displayed in Figure 2A and B.

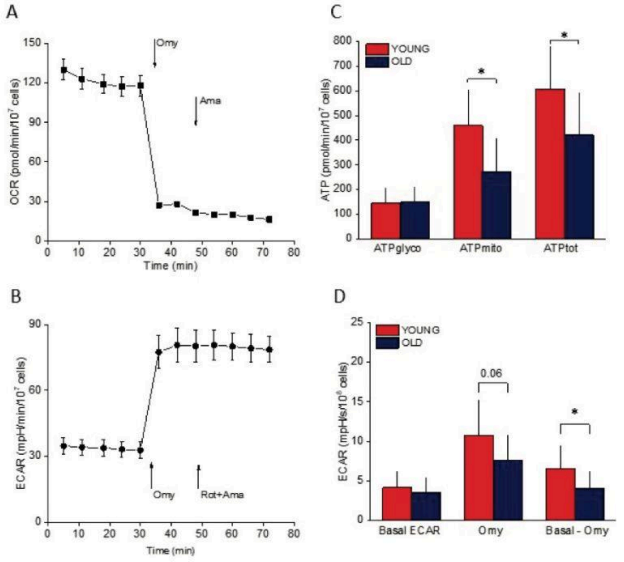


Fig. 2. ATP rate assay. (**A**) OCR (oxygen consumption rate) in a single experiment. Omy=oligomycin, Ama=antimycin A, Rot=rotenone. (**B**) ECAR (extracellular acidification rate) in the same single experiment. (**C**) ATP production rate in the platelets isolated from younger (YOUNG) and older adults (OLD). ATPglyco=glycolytic ATP production, ATPmito=mitochondrial ATP production, ATPtot=total ATP production. (**D**) ECAR in the platelets isolated from younger (YOUNG) and older adults (OLD). Omy=ECAR after oligomycin, Basal – Omy=difference between basal ECAR and ECAR after Omy injection. All bioenergetic measurements were normalized to 10^7 or 10^8 cells.* $p<0.05$.

Data presentation and statistics

Results are presented as means ± SD. After testing for normality of distribution (Shapiro-Wilk test), statistical analyses were performed using the unpaired 2-tailed Student's *t*-test, paired 2-tailed Student's *t*-test or Mann-Whitney U test, where appropriate. To test for significant correlations between mitochondrial parameters acquired by the two methods used, Spearman's rank correlation coefficients (ρ) were calculated. Values of $p<0.05$ were considered significant. OriginPro 2017 software (OriginLab Corp., Northampton, MA, USA) was used for statistical analyses.

Results

Intact platelets

As shown in Table 2, ROUT and ETSC respiratory states determined by HRR were significantly lower in the platelets of the OLD group. Mitochondrial spare respiratory capacity determined by subtracting ROUT respiration from ETSC oxygen consumption (E-R) was also significantly lower in the platelets isolated from older participants (OLD), as was the oxygen consumption related to oxidative ATP production, i.e. the difference between states ROUT and LEAK (R-L). The state corresponding to ROUT respiration determined by MFA (Basal OCR) was also significantly higher in the platelets isolated from younger (YOUNG) compared to older (OLD) participants. In addition, determination of ATP production rate by MFA clearly showed that in the group OLD platelets, mitochondrial and total ATP production was decreased compared to the YOUNG group, but glycolytic ATP synthesis did not significantly differ between the two groups (Fig. 2).

Extracellular acidification rate (ECAR) roughly reflecting glycolysis did not differ between the two groups, however its increase after oligomycin injection (i.e. after inhibition of ATP-synthase) was significantly lower in the group OLD platelets (Fig. 2).

Table 2. Bioenergetic parameters of intact platelets determined by HRR and MFA.

HRR (O2k)	**YOUNG**	**OLD**	**p**
ROUT	10.2 ± 3.0	7.6 ± 2.5	<0.005
LEAK	1.5 ± 0.6	1.4 ± 0.7	n.s.
ETSC	14.3 ± 5.7	8.7 ± 4.4	<0.005
ROX	0.8 ± 0.4	1.0 ± 0.3	n.s.
R-L	8.7 ± 3.7	5.9 ± 2.0	<0.001
E-R	4.4 ± 4.2	1.1 ± 3.4	<0.01
R/L	7.4 ± 1.8	6.3 ± 2.3	n.s.
L/E	0.12 ± 0.06	0.20 ± 0.13	<0.05
MFA (SEAHORSE)			
OCR basal	14.5 ± 7.9	8.9 ± 4.0	<0.05
OCR leak	2.0 ± 2.5	1.3 ± 0.7	n.s.
OCR rox	3.5 ± 2.0	2.2 ± 0.8	n.s.
B-L	11.9 ± 6.4	7.6 ± 3.8	=0.06
B/L	16.3 ± 15.3	8.4 ± 4.8	n.s.
ATP glyco	146 ± 59	149 ± 59	n.s
ATP mito	460 ±143	274 ± 135	<0.01
ATP tot	606 ±173	422 ±169	<0.05
% glyco	24 ± 7	37 ± 13	<0.05

Mitochondrial respiration of intact platelets in younger and older participants of the study (YOUNG and OLD, respectively). Respiratory states are expressed as pmol $O_2/s/10^8$ platelets; ATP production rates in pmol/min/10^7 cells, values are presented as mean ± SD. ROUT=routine respiration; ETSC=capacity of the electron-transporting system; ROX=residual oxygen consumption; R-L=routine – leak respiration related to oxidative ATP production, net routine respiration; R/L=routine/leak respiration; L/E=leak/ETSC, coupling control ratio; E-R=difference of ETSC and routine respiration, reserve capacity; OCR – oxygen consumption rate; B-L=difference of basal and leak respiration related to oxidative ATP production; B/L=basal/leak respiration; ATP glyco=glycolytic ATP production rate; ATP mito=oxidative ATP production rate; ATP tot=total ATP production rate; % glyco=glycolytic to total ATP production in %. For precise definition of respiratory states and inhibitors and uncoupler utilized, see Methods. n.s.=not significant.

Permeabilized platelets

In the YOUNG group platelets, there was a trend to display slightly higher oxygen consumption than in the OLD one in all measured states (Table 3). Significant differences were reached in the states LEAK after malate and palmitoyl carnitine (LEAK-FAO), OXPHOS after succinate (OXPHOS-FAO+I+II), ETSC after FCCP (ETSC-FAO+I+II) and rotenone (ETSC-II); the most prominent decline in the group OLD platelets was observed after TMPD (CIV; Table 3). In the platelets isolated from the older adults (OLD), phosphorylating states were decreased by 20 to 24 %, uncoupled states by 25 to 44 %.

Seahorse and O2k

Resting oxygen consumption rates of the intact platelets determined by both methods (i.e. ROUT in HRR and Basal OCR in MFA) significantly correlated ($R=0.64$; $p<0.001$); however expressed per the same unit (i.e. pmol $O_2/10^8$ cells/s), platelets measured by MFA displayed significantly higher OCRs than those measured by HRR ($p<0.01$). Additional significant correlations were found between similar parameters measured by HRR (O2k) or MFA (Seahorse) in intact cells: ρ was 0.55 ($p<0.001$) for R-L (HRR) and Basal OCR-Leak OCR (MFA) and 0.43 ($p<0.05$) for R-L (HRR) and mitochondrial ATP production (MFA). Basal OCR also significantly correlated with ETSC in the intact cells ($\rho=0.49$; $p<0.05$).

Table 3. Respiratory parameters of permeabilized platelets determined by HRR.

STATE	**SUIT**	**YOUNG**	**OLD**	**p**	**O/Y %**
ROUT		7.03 ± 2.4	6.4 ± 1.9	n.s.	91
	+ dig	2.9 ± 1.3	1.7 ± 0.9		
LEAK-FAO	+M + Pcar	5.0 ± 1.6	3.5 ± 1.6	<0.01	70
OXPHOS-FAO	+ D	9.4 ± 5.2	7.1 ± 4.0	n.s.	76
OXPHOS-FAOc	+ c	9.2 ± 5.5	7.6 ± 4.2	n.s.	83
OXPHOS-FAO+I	+G	13.1 ± 8.3	10.6 ± 5.7	n.s.	81
OXPHOS-FAO+IP	+ P	12.8 ± 8.0	10.1 ± 5.4	n.s.	79
OXPHOS-FAO+I+II	+ S	24.8 ± 10.5	18.9 ± 7.1	<0.05	76
LEAK-OMY	+ Omy	5.6 ± 1.6	5.1 ± 1.3	n.s.	91
ETSC-FAO+I+II	+ FCCP	27.4 ± 13.2	19.6 ± 8.8	<0.05	72
ETSC-II	+ Rot	13.8 ± 6.6	8.9 ± 4.9	<0.05	64
CIV	+ TMPD/Asc + Azd	76.5 ± 23.5	42.6 ± 12.9	<0.0001	56

Mitochondrial respiration of permeabilized platelets in YOUNG (Y) and OLD (O) participants of the study. Respiratory states are expressed as pmol $O_2/s/10^8$ platelets; values are presented as mean ± SD. n.s.=not significant. ROUT=routine respiration; LEAK-FAO=leak respiration after addition of palmitoyl-L-carnitine; OXPHOS=active phosphorylating respiration with palmitoyl-L-carnitine, substrates providing electrons to Complex I (I) and succinate (I+II); LEAK-OMY=leak respiration after addition of oligomycin; ETSC-II=electron-transporting system capacity after inhibition of Complex I by rotenone; CIV=uncoupled respiratory capacity of Complex IV; dig=digitonin; M=malate; Pcar=palmitoyl-L-carnitine; D=ADP; c=cytochrome c; G=glutamate; P=pyruvate; S=succinate. For the concentrations of substrates, inhibitors and uncoupler utilized, see Methods.

Discussion

Over the last decade, a number of studies have explored the potential use of mitochondrial analysis of peripheral blood cells to judge on overall mitochondrial condition of organs that are not accessible *in vivo* (Petrus *et al.* 2019). Evaluation of bioenergetic function of circulating cells might help in search for easily detectable biomarkers in early diagnosis of neurodegenerative or inflammatory diseases (Fišar *et al.* 2016, Sjövall *et al.* 2013) and/or monitoring the effects of therapeutic interventions, like physical training (Gatterer *et al.* 2018) or diet (Bajracharya *et al.* 2019). However, the results of many studies are conflicting showing either significant correlations between bioenergetic parameters of the blood cells and various organs (Tyrrell *et al.* 2016, Braganza *et al.* 2019) or declaring no relationship between mitochondrial respiratory variables measured in circulating cells and skeletal muscle (Hedges *et al.* 2019, Rose *et al.* 2019).

In the present study, we assessed mitochondrial respiration of platelets isolated from younger and older adults using two methods, HRR and MFA to cover more aspects of platelet mitochondrial physiology and ATP-production processes. Using HRR, we measured oxygen consumption in permeabilized platelets enabling determination of phosphorylating and electron-transporting capacities of the respiratory complexes in a sequential manner; evaluation of mitochondrial respiration in intact platelets was used to estimate bioenergetic profile of platelets resembling the *in vivo* conditions (Pesta and Gnaiger 2012). MFA performed in parallel on the same platelets allowed us to compare basal oxygen consumption, leak respiration and residual oxygen consumption to corresponding respiratory states acquired by HRR and to evaluate ATP production rate using a reliable method (Mookerjee *et al.* 2017). We have decided to use isolated platelets for two reasons: 1. The isolation procedure of platelets is faster and simpler than isolation of peripheral blood mononuclear cell (PBMC) or even individual subtypes of white blood cells; 2. Platelets, although anuclear, represent relatively homogenous source of mitochondria unlike PBMC, consisting of monocytes and lymphocytes that have different bioenergetic profiles (Chacko *et al.* 2013).

It is generally accepted that aging is associated with a decline of many mitochondrial functions including oxygen consumption rate and ATP production (Boengler *et al.* 2017). Ample evidence of compromised mitochondrial function exists for aged skeletal muscle: multiple studies documented declining ATP production rate, increased H^+ permeability of the inner membrane,

reduced mitochondrial electron-transporting capacity or decreased activities of complexes I and IV (Boffoli *et al.* 1994, Cooper *et al.* 1992, Navarro and Boveris 2007, Porter *et al.* 2015). Similar findings were reported also in the heart, brain, liver or kidney (Choksi *et al.* 2011, Ojaimi *et al.* 1999). The reports of age-related decline in platelet mitochondrial respiration or ATP generation are far less numerous. In the study of Sjövall *et al.* (2013) performed on intact and permeabilized platelets of adults aged 19-65 years and children (1 month-12 years), mitochondrial oxygen consumption was determined using HRR. ROUT respiration tended to increase with age, whereas ETSC-II oxygen consumption displayed an opposite trend. These changes were attributed to the differences between the pediatric and adult cohorts included in the research. In our study, HRR variables in both intact and permeabilized platelets had comparable absolute values; however, more statistically significant differences we found: platelets isolated from older adults displayed significantly lower uncoupled respirations, i.e. ETSC-ETF+I+II, ETSC-II, CIV (permeabilized cells) and ETSC (intact platelets) than those acquired from younger participants. In addition, besides lower uncoupled respiratory states, intact platelets isolated from older participants showed also lower routine respiration, ATP-linked oxygen consumption (R-L), and reserve capacity (E-R) than those isolated from younger donors. This difference could be related to the age of our older volunteers (at least 70 years) compared to the Swedish cohort (65 years at the maximum). In another study performed on platelets isolated from young (age 18-35 years) and older (86-93 years) adults using MFA (Braganza *et al.* 2019), basal OCR and ATP-linked OCR were lower in older population, which is concordant with our study.

The relative contribution of the energy-generating processes in the platelets (i.e. glycolysis and oxidative phosphorylation) is still a matter of debate. According to the published data, mitochondrial ATP production accounts for 35 to 85 % of the energy production and glycolysis for remaining 15 to 65 % (Kilkson *et al.* 1984, Ravi *et al.* 2015, Akkerman and Holmsen 1981). The results of our study show that mitochondrial ATP production represented 75 % of the total ATP synthesis rate in young adults and that it was significantly decreased in the platelets of aged persons. In contrast, ATP generation linked to glycolysis was well preserved even in the advanced age. Positive significant correlation between the R-L parameter measured in the intact cells by HRR and mitochondrial ATP production determined by MFA confirms that this variable can be taken as a rough estimation of ATP production in mitochondria also when HRR is used and corroborates good compatibility of both methods. Studies dealing with the impact of aging on platelet ATP production are rare. Shi *et al.* (2008) reported no difference in ATP content in platelets between young and aged healthy subjects, others judged on age-related decreasing ATP production in the platelets from oxygen consumption rates (Braganza *et al.* 2019).

Study limitations

Although both methods used for evaluation of mitochondrial respiration and extramitochondrial ATP production in this study provided comparable results, it should be noted that respiratory rates measured by MFA were significantly higher than corresponding mitochondrial parameters acquired by HRR. We believe that it could be related to different status of platelets in O2k oxygraph chambers where the platelets are continuously stirred and during the assay, it is possible to check their potential aggregation, and Seahorse analyzer where the platelets have to be stuck on the bottom of the well and their at least partial mechanical activation cannot be excluded (Qiu *et al.* 2014).

Another issue is the recruitment of the control volunteers at the advanced age (Malay and Chung 2012, Mody *et al.* 2008). As noted above, in this study, only 7 participants (of 76) declared no important medical history and did not take any medication. The extent to which such a selection could be regarded as a representative control group if platelet mitochondrial parameters are evaluated as a potential marker of various diseases is questionable. Altered platelet mitochondrial consumption has been found in a number of diseases that are frequently diagnosed simultaneously in older people (Petrus *et al.* 2019, Wang *et al.* 2017). Nevertheless, in this study, we aimed to assess the impact of aging *per se* on platelet bioenergetics.

The potential impact of gender could not be addressed in this study due to unequal distribution of males and females in the OLD group. However, no correlation between respiratory parameters and gender were seen neither in intact nor permeabilized platelets in the study of Sjövall *et al.* (2013).

Conclusions

We have verified compromised mitochondrial respiration and oxidative ATP production in the platelets of older persons. In addition, our study documents good compatibility of the two most widely used methods for determining the global performance of the electron-transporting system, i.e. HRR and MFA.

Conflict of Interest

There is no conflict of interest.

Acknowledgements

This research was funded by the project of the Grant Agency of the Charles University No. 966120, the Charles University Research Fund (project no. Q39), project No. CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_019/0000787 Fighting Infectious Diseases awarded by the MEYS CR, financed from EFRR, project No. CZ.02.1.01/0.0/0.0/17_048/0007267, "Research and Development of Intelligent Components of Advanced Technologies for the Pilsen Metropolitan Area (InteCom)", awarded by the MEYS CR, financed from ERDF CZ, and the Specific Student Research Project Nr. 260538/2020 of the Charles University.

References

AKKERMAN JW, HOLMSEN H: Interrelationships among platelet responses: studies on the burst in proton liberation, lactate production, and oxygen uptake during platelet aggregation and Ca2+ secretion. Blood 57: 956-966, 1981. https://doi.org/10.1182/blood.V57.5.956.bloodjournal575956

ALEXIOU A, NIZAMI B, KHAN FI, SOURSOU G, VAIRAKTARAKIS C, CHATZICHRONIS S, TSIAMIS V, MANZTAVINOS V, YARLA NS, MD ASHRAF G: Mitochondrial dynamics and proteins related to neurodegenerative diseases. Curr Protein Pept Sci 19: 850-857, 2018. https://doi.org/10.2174/1389203718666170810150151

BAJRACHARYA R, YOUNGSON NA, BALLARD JWO: Dietary macronutrient management to treat mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. Int J Mol Sci 20: 1850, 2019. https://doi.org/10.3390/ijms20081850

BOENGLER K, KOSIOL M, MAYR M, SCHULZ R, ROHRBACH S: Mitochondria and ageing: Role in heart, skeletal muscle and adipose tissue. J Cachexia Sarcopenia Muscle 8: 349-369, 2017. https://doi.org/10.1002/jcsm.12178

BOFFOLI D, SCACCO SC, VERGARI R, SOLARINO G, SANTACROCE G, PAPA S: Decline with age of the respiratory chain activity in human skeletal muscle. Biochim Biophys Acta 1226: 73-82, 1994. https://doi.org/10.1016/0925-4439(94)90061-2

BRAGANZA A, COREY CG, SANTANASTO AJ, DISTEFANO G, COEN PM, GLYNN NW, NOURAIE SM, GOODPASTER BH, NEWMAN AB, SHIVA S: Platelet bioenergetics correlate with muscle energetics and are altered in older adults. JCI Insight 5: e128248, 2019. https://doi.org/10.1172/jci.insight.128248

CHACKO BK, KRAMER PA, RAVI S, JOHNSON MS, HARDY RW, BALLINGER SW, DARLEY-USMAR VM: Methods for defining distinct bioenergetic profiles in platelets, lymphocytes, monocytes, and neutrophils, and the oxidative burst from human blood. Lab Invest 93: 690-700, 2013. https://doi.org/10.1038/labinvest.2013.53

CHOKSI KB, NUSS JE, DEFORD JH, PAPACONSTANTINOU J: Mitochondrial electron transport chain functions in long-lived Ames dwarf mice. Aging 3: 754-767, 2011. https://doi.org/10.18632/aging.100357

COOPER JM, MANN VM, SCHAPIRA AH: Analyses of mitochondrial respiratory chain function and mitochondrial DNA deletion in human skeletal muscle: effect of ageing. J Neurol Sci 113: 91-98, 1992. https://doi.org/10.1016/0022-510X(92)90270-U

FIŠAR Z, HROUDOVÁ J, HANSÍKOVÁ H, SPÁČILOVÁ J, LELKOVÁ P, WENCHICH L, JIRÁK R, ZVĚŘOVÁ M, ZEMAN J, MARTÁSEK P, RABOCH J: Mitochondrial respiration in the platelets of patients with Alzheimer's disease. Curr Alzheimer Res 13: 930-941, 2016. https://doi.org/10.2174/1567205013666160314150856

GATTERER H, MENZ V, SALAZAR-MARTINEZ E, SUMBALOVA Z, GARCIA-SOUZA LF, VELIKA B, GNAIGER E, BURTSCHER M: Exercise performance, muscle oxygen extraction and blood cell mitochondrial respiration after repeated-sprint and sprint interval training in hypoxia: A pilot study. J Sports Sci Med 17: 339-347, 2018.

HEDGES CP, WOODHEAD JST, WANG HW, MITCHELL CJ, CAMERON-SMITH D, HICKEY AJR, MERRY TL: Peripheral blood mononuclear cells do not reflect skeletal muscle mitochondrial function or adaptation to high-intensity interval training in healthy young men. J Appl Physiol 126: 454-461, 2019. https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00777.2018

JAVADOV S, KOZLOV AV, CAMARA AKS: Mitochondria in health and diseases. Cells 9: 1177, 2020. https://doi.org/10.3390/cells9051177

JOSEPH AM, ADHIHETTY PJ, BUFORD TW, WOHLGEMUTH SE, LEES HA, NGUYEN LM, ARANDA JM, SANDESARA BD, PAHOR M, MANINI TM, MARZETTI E, LEEUWENBURGH C: The impact of aging on mitochondrial function and biogenesis pathways in skeletal muscle of sedentary high- and low-functioning elderly individuals. Aging Cell 11: 801-809, 2012. https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2012.00844.x

KILKSON H, HOLME S, MURPHY S: Platelet metabolism during storage of platelet concentrates at 22 degrees C. Blood 64: 406-414, 1984. https://doi.org/10.1182/blood.V64.2.406.bloodjournal642406

LEENAARS CHC, KOUWENAAR C, STAFLEU FR, BLEICH A, RITSKES-HOITINGA M, DE VRIES RBM, MEIJBOOM FLB: Animal to human translation: a systematic scoping review of reported concordance rates. J Transl Med 17: 223, 2019. https://doi.org/10.1186/s12967-019-1976-2

MALAY S, CHUNG KC: The choice of controls for providing validity and evidence in clinical research. Plast Reconstr Surg 130: 959-965, 2012. https://doi.org/10.1097/PRS.0b013e318262f4c8

MELCHINGER H, JAIN K, TYAGI T, HWA J: Role of platelet mitochondria: Life in a nucleus-free zone. Front Cardiovasc Med 6: 153, 2019. https://doi.org/10.3389/fcvm.2019.00153

MODY L, MILLER DK, MCGLOIN JM, FREEMAN M, MARCANTONIO ER, MAGAZINER J, STUDENSKI S: Recruitment and retention of older adults in aging research. J Am Geriatr Soc 56: 2340-2348, 2008. https://doi.org/10.1111/j.1532-5415.2008.02015.x

MOOKERJEE SA, GERENCSER AA, NICHOLLS DG, BRAND MD: Quantifying intracellular rates of glycolytic and oxidative ATP production and consumption using extracellular flux measurements. J Biol Chem 292: 7189-7207, 2017. https://doi.org/10.1074/jbc.M116.774471

NAVARRO A, BOVERIS A: The mitochondrial energy transduction system and the aging process. Am J Physiol Cell Physiol 292: C670-C686, 2007. https://doi.org/10.1152/ajpcell.00213.2006

OJAIMI J, MASTERS CL, OPESKIN K, MCKELVIE P, BYRNE E: Mitochondrial respiratory chain activity in the human brain as a function of age. Mech Ageing Dev 111: 39-47, 1999. https://doi.org/10.1016/S0047-6374(99)00071-8

PESTA D, GNAIGER E: High-resolution respirometry: OXPHOS protocols for human cells and permeabilized fibers from small biopsies of human muscle. Methods Mol Biol 810: 25-58, 2012. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-382-0_3

PETRUS AT, LIGHEZAN DL, DANILA MD, DUICU OM, STURZA A, MUNTEAN DM, IONITA I: Assessment of platelet respiration as emerging biomarker of disease. Physiol Res 68: 347-363, 2019. https://doi.org/10.33549/physiolres.934032

PORTER C, HURREN NM, COTTER MV, BHATTARAI N, REIDY PT, DILLON EL, DURHAM WJ, TUVDENDORJ D, SHEFFIELD-MOORE M, VOLPI E, SIDOSSIS LS, RASMUSSEN BB, BØRSHEIM E: Mitochondrial respiratory capacity and coupling control decline with age in human skeletal muscle. Am J Physiol Endocrinol Metab 309: E224-E232, 2015. https://doi.org/10.1152/ajpendo.00125.2015

QIU Y, BROWN AC, MYERS DR, SAKURAI Y, MANNINO RG, TRAN R, AHN B, HARDY ET, KEE MF, KUMAR S, BAO G, BARKER TH, LAM WA: Platelet mechanosensing of substrate stiffness during clot formation mediates adhesion, spreading, and activation. Proc Natl Acad Sci U S A 111: 14430-14435, 2014. https://doi.org/10.1073/pnas.1322917111

RAVI S, CHACKO B, SAWADA H, KRAMER PA, JOHNSON MS, BENAVIDES GA, O'DONNELL V, MARQUES MB, DARLEY-USMAR VM: Metabolic plasticity in resting and thrombin activated platelets. PLoS One 10: e0123597, 2015. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123597

ROSE S, CARVALHO E, DIAZ EC, COTTER M, BENNURI SC, AZHAR G, FRYE RE, ADAMS SH, BØRSHEIM E: A comparative study of mitochondrial respiration in circulating blood cells and skeletal muscle fibers in women. Am J Physiol Endocrinol Metab 317: E503-E512, 2019. https://doi.org/10.1152/ajpendo.00084.2019

SCHAPIRA AH: Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. Adv Neurol 60: 288-291, 1993.

SHI C, GUO K, YEW DT, YAO Z, FORSTER EL, WANG H, XU J: Effects of ageing and Alzheimer's disease on mitochondrial function of human platelets. Exp Gerontol 43: 589-594, 2008. https://doi.org/10.1016/j.exger.2008.02.004

SJÖVALL F, EHINGER JK, MARELSSON SE, MOROTA S, FROSTNER EA, UCHINO H, LUNDGREN J, ARNBJÖRNSSON E, HANSSON MJ, FELLMAN V, ELMÉR E: Mitochondrial respiration in human viable platelets - methodology and influence of gender, age and storage. Mitochondrion 13: 7-14, 2013. https://doi.org/10.1016/j.mito.2012.11.001

TYRRELL DJ, BHARADWAJ MS, JORGENSEN MJ, REGISTER TC, MOLINA AJ: Blood cell respirometry is associated with skeletal and cardiac muscle bioenergetics: Implications for a minimally invasive biomarker of mitochondrial health. Redox Biol 10: 65-77, 2016. https://doi.org/10.1016/j.redox.2016.09.009

TYRRELL DJ, BHARADWAJ MS, VAN HORN CG, KRITCHEVSKY SB, NICKLAS BJ, MOLINA AJ: Respirometric profiling of muscle mitochondria and blood cells are associated with differences in gait speed among community-dwelling older adults. J Gerontol A Biol Sci Med Sci 70: 1394-1399, 2014. https://doi.org/10.1093/gerona/glu096

VEVERA J, FIŠAR Z, NEKOVÁŘOVÁ T, VRABLÍK M, ZLATOHLÁVEK L, HROUDOVÁ J, SINGH N, RABOCH J, VALEŠ K: Statin-induced changes in mitochondrial respiration in blood platelets in rats and human with dyslipidemia. Physiol Res 65: 777-788, 2016. https://doi.org/10.33549/physiolres.933264

WANG L, WU Q, FAN Z, XIE R, WANG Z, LU Y: Platelet mitochondrial dysfunction and the correlation with human diseases. Biochem Soc Trans 45: 1213, 2017. https://doi.org/10.1042/BST20170291

YU H, HU W, SONG X, ZHAO Y: Immune modulation of platelet-derived mitochondria on memory CD4(+) T cells in humans. Int J Mol Sci 21: 6295, 2020. https://doi.org/10.3390/ijms21176295

Physiol. Res. 71 (Suppl. 2): S227-S236, 2022 *https://doi.org/10.33549/physiolres.934995*

Impact of Aging on Mitochondrial Respiration in Various Organs

Jan JEDLIČKA[1], Zdeněk TŮMA[2], Karim RAZAK[1], Radovan KUNC[1,3], Annu KALA[2], Stephanie PROSKAUER PEÑA[2], Tobias LERCHNER[1], Karel JEŽEK[2], Jitka KUNCOVÁ[1,2]

[1]Institute of Physiology, Faculty of Medicine in Plzeň, Charles University, Plzeň, Czech Republic, [2]Biomedical Centre, Faculty of Medicine in Plzeň, Charles University, Plzeň, Czech Republic, [3]Institute of Social Medicine, Faculty of Medicine in Plzeň, Charles University, Plzeň, Czech Republic

Received April 19, 2022
Accepted October 14, 2022

Summary

Mitochondria are considered central regulator of the aging process; however, majority of studies dealing with the impact of age on mitochondrial oxygen consumption focused on skeletal muscle concluding (although not uniformly) a general declining trend with advancing age. In addition, gender related differences in mitochondrial respiration have not been satisfactorily described yet. The aim of the present study was to evaluate mitochondrial oxygen consumption in various organs of aging male and female Fischer 344 rats at the ages of 6, 12 and 24 months. Mitochondrial respiration of homogenized (skeletal muscle, left and right heart ventricle, hippocampus, cerebellum, kidney cortex), gently mechanically permeabilized (liver) tissue or intact cells (platelets) was determined using high-resolution respirometry (oxygraphs O2k, Oroboros, Austria). The pattern of age-related changes differed in each tissue: in the skeletal muscle and kidney cortex of both sexes and in female heart, parameters of mitochondrial respiration significantly declined with age. Resting respiration of intact platelets displayed an increasing trend and it did not correlate with skeletal muscle respiratory states. In the heart of male rats and brain tissues of both sexes, respiratory states remained relatively stable over analyzed age categories with few exceptions of lower mitochondrial oxygen consumption at the age of 24 months. In the liver, OXPHOS capacity was higher in females than in males with either no difference between the ages of 6 and 24 months or even significant increase at the age of 24 months in the male rats. In conclusion, the results of our study indicate that the concept of general pattern of age-dependent decline in mitochondrial oxygen consumption across different organs and tissues could be misleading. Also, the statement of higher mitochondrial respiration in females seems to be conflicting, since the gender-related differences may vary with the tissue studied, combination of substrates used and might be better detectable at younger ages than in old animals.

Key words

Aging • Mitochondria • Gender differences • High-resolution respirometry

Corresponding author

J. Jedlička, Institute of Physiology, Faculty of Medicine in Plzeň, Charles University, alej Svobody 76, 323 00, Plzeň, Czech Republic. E-mail: jan.jedlicka@lfp.cuni.cz

Introduction

Aging is a complex process affected by both intrinsic and extrinsic factors, like genetic background, metabolic fitness, age-related diseases, nutrition, lifestyle or mobility [1]. There is ample evidence that mitochondria play an important role in the aging process [2-4]. The function of the electron transport system, located in the inner mitochondrial membrane is an important subject of the aging research not only as a source of high-energy substrates for the cellular metabolic processes but also as a major reactive oxygen species (ROS) producer. On the one hand, mitochondrial theory of aging suggests that the organelle is both the source and the target of harmful and aging promoting ROS [5]. On the other hand, ROS have an indispensable role in the cellular signalling and some studies even indicate a positive correlation between higher ROS and longevity [6].

PHYSIOLOGICAL RESEARCH • ISSN 1802-9973 (online) - an open access article under the CC BY-NC-ND 4.0 license
© 2022 Institute of Physiology of the Czech Academy of Sciences, Prague, Czech Republic
Fax +420 241 062 164, e-mail: physres@fgu.cas.cz, www.biomed.cas.cz/physiolres

Although most studies dealing with age-related mitochondrial oxygen consumption in rodents state that the efficiency of oxidative phosphorylation decreases with age [7,8], they are mainly based on analysis of the skeletal muscle mitochondria concluding that alterations in bioenergetics situation in different tissues follow a common general pattern. However, the results of research performed on other organs and tissues suggested that the dysfunction of mitochondrial electron transporting system might not be an automatic process associated with aging [9]. In addition, studies dealing with analysis of mitochondrial bioenergetics in more than two organs are extremely rare and they mostly focus on the male population only [10-12]. Tissue-specific morphology and function of mitochondria, method of sample preparation (isolated mitochondria, permeabilized or homogenized tissue), differences in methodology (spectrophotometry, oxygraphy, different media and substrates), species, gender and age of experimental animals used, represent the factors contributing to difficulties in comparison of results of different studies [13] and make the conclusion about the overall decline of mitochondrial respiration with age problematic.

Over the last decade, respirometric evaluation of platelets has become popular since they are easily available in humans and some studies suggested that their respiratory activity might reflect mitochondrial fitness of some metabolically active organs like heart, liver and brain [14]. In our recent paper, we described a decrease in routine and uncoupled respiration of aged human platelets [15]. Other studies reported significant defects in complex I [16]. The data on the impact of aging on platelet mitochondrial oxygen consumption in rodents are not available yet.

In the present study, we decided to perform a complex respirometric analysis of various organs and tissues (left and right heart ventricle, hippocampus, cerebellum, skeletal muscle, cortex of the kidney, liver, and platelets) in 6, 12 and 24 months old sedentary Fischer 344 male and female rats. The aims were not only to make the comparison of the impact of aging on mitochondrial activity across various organs possible, but also to reveal potential sex-related differences in more age categories.

Materials and Methods

Solutions and chemicals

The composition of solutions used in the experiments was: BIOPS preservation solution – CaK_2EGTA 2.77 mmol/l, K_2EGTA 7.23 mmol/l, imidazole 20 mmol/l, taurine 20 mmol/l, 50 mmol/l, MES hydrate, 50 mmol/l dithiothreitol, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 6.56 mmol/l, Na_2ATP 5.77 mmol/l, Na_2phosphocreatine 15 mmol/l, pH 7.1; MIR05 respiration medium: EGTA 0.5 mmol/l, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 3 mmol/l, potassium lactobionate 60 mmol/l, taurine 20 mmol/l, KH_2PO_4 10 mmol/l, HEPES 20 mmol/l, sucrose 110 mmol/l, fatty acid free bovine serum albumin 1 g/l, pH 7.0 [17]; PBSG medium: $Na_2HPO_4 \cdot 7H_20$ 7.5 mmol/l, $NaH_2PO_4 \cdot H_20$ 2.5 mmol/l, NaCl 137 mmol/l, KCl 2.7 mmol/l, glucose 10 mmol/l; procaine solution: procaine hydrochloride 86 mmol/l and NaCl 34 mmol/l. If not stated otherwise, chemicals were from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, United States). All chemicals were of analytical grade.

Animals

For experiments, we used Fischer 344 rats obtained from local breeding colony at the Faculty of Medicine in Pilsen, Charles University. Animals were divided into 6-, 12- and 24-month-old cohorts. The rats were housed in pairs on wood chip bedding at 23±2 °C under 12-hr light/dark cycles and provided with food and water ad libitum. All the experiments were performed in accordance with the European Directive for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes (86/609/EU) and were approved by the Animal Welfare Advisory Committee at the Faculty of Medicine in Pilsen and by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (approval ID: MSMT 19751/2020-2).

Experimental protocols

At the day of experiment, the animals were weighed and anaesthetized with intraperitoneal urethane (1 g/kg body weight). Then, the rats were sacrificed by decapitation; organs of interest (hippocampus, cerebellum, heart, kidney, liver, skeletal muscle) were quickly excised and kept on ice in the preservation solution BIOPS. For subsequent respirometric analyses, the tissue samples (muscle, heart, kidney cortex, brain) were homogenized by PBI-Shredder O2k-Set (Oroboros instruments; Innsbruck Austria) or gently mechanically permeabilized with a pair of sharp forceps (liver). Samples were taken from the following locations: mixed red and white fibers from the soleus muscle, proximal anterior free wall of the right and left ventricles, lobus hepatis dexter medialis (liver), cortex of the kidney and

cerebellum and the whole hippocampus. Whole blood collected after cervical dislocation was mixed with 100 µl K_2EDTA (75 mmol/l) and prostaglandin E1 (62.5 ng/ml) to prevent blood clotting and activation of platelets during the procedure. Platelets were isolated from platelet-rich plasma (PRP) obtained by centrifugation at 300× g for 20 min at 25 °C with no brake. PRP was then centrifuged again at 1500× g for 10 min at 25 °C and the platelet pellet was resuspended in the final medium consisting of 50 % of PBSG and 50 % of rat's own plasma. Platelets were counted in Bürker's chamber after washing in the procaine solution for 10 min. Final platelet concentration was adjusted to 150-350×10^9/l.

Evaluation of mitochondrial respiration using high-resolution respirometry (HRR; O2k)

Mitochondrial respiration of the tissue samples (mass per chamber: heart ventricles 0.8 mg; hippocampus 3 mg; cerebellum 2.5 mg; skeletal muscle 3 mg; kidney cortex 1 mg; liver 1.5 mg; results were then normalized to tissue wet mass) was analyzed in 4 calibrated O2k oxygraphs (Oxygraph-2k, Oroboros Instruments, Innsbruck, Austria) in the MiR05 medium at 37 °C using the following substrate-uncoupler-inhibitor-titration protocols (SUIT) [17] for the heart, muscle, kidney, and liver samples – malate (M; 0.1 mmol/l) and palmitoyl-L-carnitine (Pcar; 0.04 mmol/l) – adenosine diphosphate (D; 5 mmol/l) – cytochrome c (c; 10 µmol/l) – glutamate (G; 10 mmol/l) – pyruvate (P; 5 mmol/l) – succinate (S; 50 mmol/l) – carbonyl cyanide p-trifluoromethoxy-phenylhydrazone (FCCP; 0.5 µmol/l titrations) – rotenone (Rot; 0.5 µmol/l) – antimycin A (Ama; 2.5 µg/ml) – N,N,N′,N′-tetramethyl-p-phenylenediamine (TMPD; 0.5 mmol/l) in the presence of ascorbate (Asc; 2 mmol/l) – sodium azide (Azd; 100 mmol/l). The respiratory states induced by individual titrations started with non-phosphorylating leak state when metabolism of fatty acids was activated after addition of M and Pcar (L_{FAO}), continued with active phosphorylating respiration after D and c (OXPHOS-FAO; P_{FAO}), coupled phosphorylating respirations after injection of G and P providing electrons to Complex I (OXPHOS-FAO+I; P_{FAO+I}) and S as a substrate of Complex II (OXPHOS-FAO+I+II; $P_{FAO+I+II}$). FCCP titrations induced the uncoupled state providing the information about the capacity of the electron-transporting system (ETSC-FAO+I+II; $E_{FAO+I+II}$); after injection of the Complex I inhibitor Rot, oxygen consumption was reduced to the Complex II only (ETSC-II; E_{II}); Complex III inhibitor Ama allowed to measure residual oxygen consumption (ROX), and TMPD/Asc after subtraction of Azd oxygen consumption enabled the estimation of the capacity of Complex IV (C_{IV}). For the brain samples (hippocampus and cerebellum), the following SUIT protocol was used: M – G (L_I) – D – c – P (P_I) – S (P_{I+II}) – FCCP (E_{I+II}) – Rot (E_{II}) – Ama (ROX) – Asc/TMPD – Azd (C_{IV}). Oxygen consumption of the intact platelets was measured in 50 % of PBSG and 50 % of rat's own plasma without no addition (routine respiration; ROUT; R), after ATP-synthase inhibitor oligomycin (Omy; 2 µg/ml) injection (L), FCCP titrations (ETSC; E), and additions of Rot and Ama (ROX).

Data presentation and statistics

Data are presented as means ± SD with 10 to 90 percentile ranges. Normality of distribution was tested using Smirnov-Kolmogorov test and, if needed, the data were processed by logarithmic transformation followed by two-way ANOVA (factors age and gender). *Post hoc* comparisons were made with *post hoc* Tukey test. Spearman's correlation coefficients were calculated for skeletal muscle and platelet respirometric parameters. The analyses were performed using the software Origin 2017 (OriginLab, Corp., Northampton, MA, United States). Values of $p<0.05$ were considered significant.

Results

Skeletal muscle and platelets

As shown in Figure 1, parameters of mitochondrial respiration in the skeletal muscle significantly declined with age in both sexes (P_{FAO}, P_{FAO+I}, $P_{FAO+I+II}$, C_{IV}). Samples isolated from younger animals (6M and 12M) displayed also significant sex-related differences with higher oxygen consumption rates in males. This difference disappeared at the age of 24 months (Fig. 1A-D). The capacity of the electron transporting system ($E_{FAO+I+II}$) was by 5-15 pmol/s/mg higher than the respective $P_{FAO+I+II}$ and displayed the same trends, i.e. decline with age occurring earlier in females than in males with no difference at the age of 24 months. The age-related pattern of the intact platelets respiration was different: ROUT respiration increased between the ages of 6 and 12 months in both sexes and it remained higher in 24-month-old female rats. No gender differences were detected at any age category. Capacity of the electron transporting system did not show any differences between individual age categories, but it was

significantly higher in males than females at the age of 12 months (Fig. 1E, F). No significant correlation was revealed between the skeletal muscle and platelet respirometric parameters.

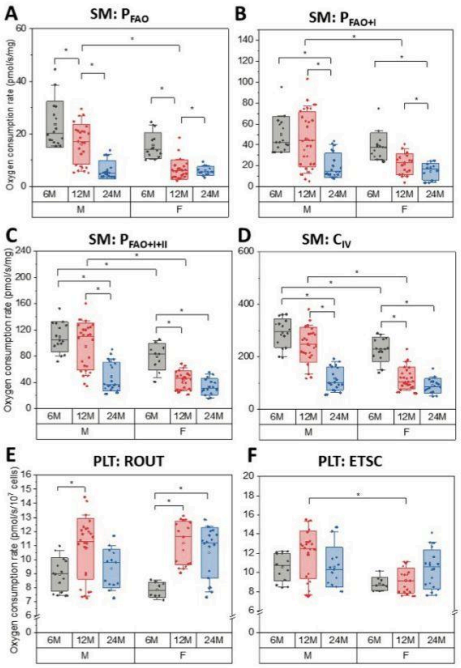


Fig. 1. Oxygen consumption rate of skeletal muscle (SM; **A-D**) normalized to mg of tissue wet weight and platelets (PLT; **E, F**) normalized to 10^7 cells in 6-, 12- and 24-month-old male (M) and female (F) Fischer 344 rats. (**A**) P_{FAO}=OXPHOS state after injection of malate (M), palmitoyl-L-carnitine (Pcar), ADP (D) and cytochrome c (c). (**B**) P_{FAO+I}=OXPHOS after M, Pcar, D, c + glutamate (G) and pyruvate (P). (**C**) $P_{FAO+I+II}$=OXPHOS after injection of M, Pcar, D, c, G, P and succinate (S). (**D**) Complex IV (C IV) capacity after Complex III inhibition and addition of TMPD with ascorbate (sodium azide-sensitive portion) and sodium azide. (**E**) ROUT=Routine respiration of intact platelets in mixed PBS+glucose and plasma (1:1) solution. (**F**) ETSC=maximum capacity of uncoupled respiration chain of platelets (after titration of uncoupler FCCP). The boxes are mean ± SD with horizontal line denoting median and whiskers showing 10 to 90 percentile range, * $p<0.05$.

Heart

In general, oxygen consumption rates were slightly lower in the right compared to the left ventricles of both sexes and significant gender-related differences were observed in P_{FAO} and C_{IV} in both ventricles of 12-month-old rats with slightly lower oxygen consumption rates in female rats. The impact of age was substantially different in males than in females. In male rats, respiratory states remained relatively stable over analyzed age categories in both ventricles with the exception of C_{IV} that was significantly lower at the age of 24 months compared to 12-month-old rats. In female rats, the declining trends in P_{FAO} and C_{IV} respiratory states were observed (Fig. 2A-F). Respiratory rates at the state $E_{FAO+I+II}$ were slightly higher than at $P_{FAO+I+II}$ and they did not display any significant differences related to age.

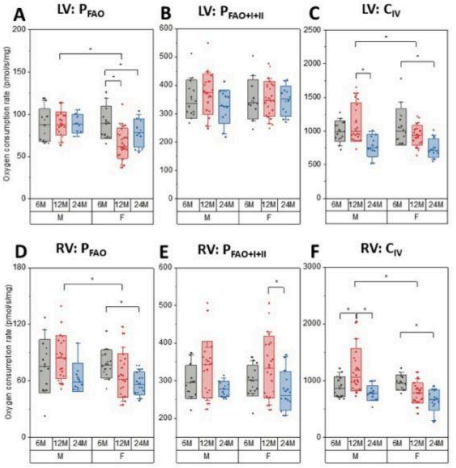


Fig. 2. Oxygen consumption rate of the left (LV; **A-C**) and right ventricle (RV; **D-F**) normalized to mg of tissue wet weight in 6-, 12- and 24-month-old male (M) and female (F) Fischer 344 rats. (**A, D**) P_{FAO}=OXPHOS state after injection of malate (M), palmitoyl-L-carnitine (Pcar), ADP (D), and cytochrome c (c). (**B, E**) $P_{FAO+I+II}$=OXPHOS after injection of M, Pcar, D, c, glutamate (G), pyruvate (P) and succinate (S). (**C, F**) Complex IV (C IV) capacity after complex III inhibition and addition of TMPD with ascorbate (sodium azide-sensitive portion) and sodium azide. The boxes are mean ± SD with horizontal line denoting median and whiskers showing 10 to 90 percentile range, * $p<0.05$.

Brain

The values of mitochondrial respiration were higher in the cerebellum than hippocampus in all analyzed respiratory states and they displayed minimum changes over age in the hippocampus. In the cerebellum, OXPHOS capacity related to Complex I was significantly lower at the age of 24 months compared to both 6-month and 12-month age categories in both sexes, whereas OXPHOS capacity related to Complex I+II was lower at

the age of 24 months compared to 12 months. The only gender-related difference was revealed in CIV activity in 12-month-old animals (Fig. 3A-F). Oxygen consumption rates at the state E_{I+II} were by ~30 pmol/s/mg higher than at P_{I+II} and they did not display any significant differences related to age in both hippocampus and cerebellum.

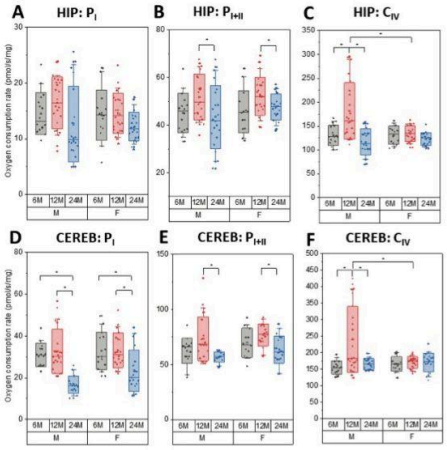


Fig. 3. Oxygen consumption rate of hippocampus (HIP; **A-C**) and cerebellum (CEREB; **D-F**) normalized to mg of tissue wet weight in 6-, 12- and 24-month-old male (M) and female (F) Fischer 344 rats. (**A, D**) P_I=OXPHOS state after injection of malate (M), glutamate (G), ADP (D) and cytochrome c (c). (**B, E**) P_{I+II}=OXPHOS after injection of M, G, D, c, pyruvate (P) and succinate (S). (**C, F**) Complex IV (C IV) capacity after complex III inhibition and addition of TMPD with ascorbate (sodium azide-sensitive portion) and sodium azide. The boxes are mean ± SD with horizontal line denoting median and whiskers showing 10 to 90 percentile range, * p<0.05.

Kidney and liver

In the kidney cortex, there was a declining trend in mitochondrial respiration linked to FAO and Complex I in both sexes (Fig. 4A-C). This difference disappeared if succinate was added to fully stimulate the Complex II-linked respiration that was even significantly higher in 12M compared to 6M males. Accordingly, $E_{FAO+I+II}$ was higher in males at the age of 12 months compared to 6M and 24M age categories. In the liver, P_{FAO} and P_{FAO+I} were lower at the age of 12 months compared to 6 months in animals of both sexes, but the values returned back or at least closer to 6-month-old values at the age of 24 months. In addition, $P_{FAO+I+II}$ was the highest at the age of 24 months. Exactly the same pattern was observed for the state $E_{FAO+I+II}$. At the ages of 6 and 12 months, there were significant differences between males and females in the respiratory states P_{FAO} and $P_{FAO+I+II}$ (Figure 4D-F).

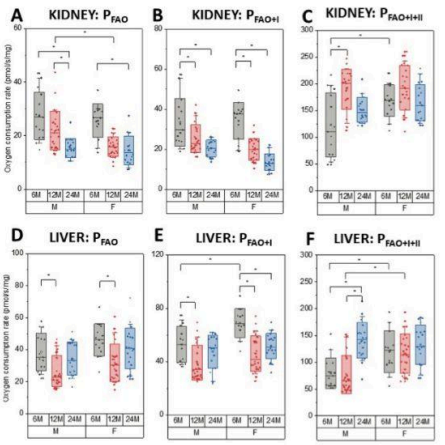


Fig. 4. Oxygen consumption rate of the kidney cortex (KIDNEY; **A-C**) and liver (**D-F**) normalized to mg of tissue wet weight in 6-, 12- and 24-month-old male (M) and female (F) Fischer 344 rats. (**A, D**) P_{FAO}=OXPHOS state after injection of malate (M), palmitoyl-L-carnitine (Pcar), ADP (D) and cytochrome c (c). (**B, E**) P_{FAO+I}=OXPHOS after injection of M, Pcar, D, c, glutamate (G), and pyruvate (P). (**C, F**) $P_{FAO+I+II}$=OXPHOS after injection of M, Pcar, D, c, G, P, and succinate. The boxes are mean ± SD with horizontal line denoting median and whiskers showing 10 to 90 percentile range, * p<0.05.

Discussion

In the present study, we assessed mitochondrial respiration in eight different tissues; heart, brain, liver and kidney belong to organs with the highest oxygen demands, skeletal muscle represents the most widely studied tissue in the aging research and platelets seem to emerge as a tool allowing insights into the bioenergetic situation of energy demanding organs [18,19]. In addition, heart, brain, and skeletal muscle are composed of post-mitotic cells; kidney cortex and liver cells can divide if they are challenged by toxins, hypoxia and other injuries [20]. We analyzed mitochondrial respiration in three age categories (6, 12, and 24 months) and separately in males and females to reveal potential sex-related differences. The maximum age of 24 months was selected as a median life span of Fischer 344 rats. Older ages are associated with dramatically increasing mortality [21].

Our study verified the age-related decline in

phosphorylating mitochondrial respiration in the skeletal muscle [7,8] and unlike other studies, it revealed significant gender-related differences in mitochondrial respiration: in the male rats, $P_{FAO+I+II}$ and C_{IV} were higher than in females at the ages of 6 and 12 months. In addition, respiratory fluxes were relatively stable in males at younger ages (6 and 12 month), whereas in females, the most prominent decline was noticed between the ages of 6 and 12 months. Some studies dealing with gender-related differences in mitochondrial functions of the skeletal muscle indicated higher oxygen consumption rates, higher mitochondrial content and higher activities of mitochondrial enzymes in female skeletal muscle, especially if the organism was challenged by caloric restriction or endurance training [22,23]. However, these studies were mostly performed on rats younger than 6 months. Another research declaring higher oxidative capacity of female skeletal muscle was performed on 15-month-old rats that, if subjected to high fat diet, displayed higher increase in mitochondrial oxygen consumption in females, but did not show any significant differences between the control male and female rats [24]. The aging studies on rat skeletal muscle are further complicated by the experimental approach (isolated mitochondria vs. permeabilized muscle fibres) and the type of muscle used. Analyses of isolated mitochondria seem to exaggerate the impact of age on mitochondrial oxygen consumption [25]. Mitochondrial dysfunction could be not only fiber type-specific [26], but also dependent on localization of isolated mitochondria since an increase in mitochondrial proton leak, a decrease in mitochondrial coupling and a decrease in mitochondrial membrane potential in subsarcolemmal but not interfibrillar mitochondria of senescent animals was reported [27,28].

In humans, skeletal muscle biopsies are relatively easily available and remain one of the rare sources of the fresh tissue samples in aging research. Both age-related decrease and no change in skeletal muscle mitochondrial function have been reported in humans [9,13,29]. In addition, some studies concluded that age-dependent decline in mitochondrial function may depend on the muscle type analyzed and result rather from low physical activity [28,30] or compromised cardiorespiratory fitness than chronological age per se [9]. An excellent meta-analysis focused on the putative gender-related differences in mitochondrial morphology and functions in humans concluded that respiration normalized to mass in human skeletal muscle does not differ between men and women [31], although some data indicate the trend towards higher values in younger women and older men [32].

Research in the field of mitochondrial respiration of platelets has indicated that platelets might serve an easily accessible pool of mitochondria that mirrors bioenergetics fitness of various organs and emerges as a promising tool in early diagnosis of some neurodegenerative diseases [18,19,33]. However, the results of other studies are completely opposite indicating no significant correlation between mitochondrial functional parameters in platelets and skeletal muscle in humans [34,35]. Our present study documents not only the age-related changes in platelet mitochondrial respiration in rats, but also very poor correlation between platelet and skeletal muscle mitochondrial respiratory parameters. Routine respiration of rat platelets increased between 6 and 12 months of age and then remained stable. Capacity of the electron transporting system did not change over all ages analyzed, but at the age of 12 months, it reached significantly higher values in males than in females, which is in line with observations on adult humans [36,37].

Relatively widely analyzed organ in association with mitochondrial aging research is the heart; studies mostly report a decrease in the electron-transporting capacity of the mitochondrial respiratory system in the male rats [38]. However, spectrophotometric analysis indicated no changes in activities of respiratory Complexes I and III, increase in Complex II and a decrease in complex IV [13]. Gender differences were only rarely studied, preferentially in younger animals [39,40]. In addition, data on the impact of aging on the intact female heart are mostly missing and little is known about putative interventricular differences in mitochondrial respiratory activity, although functional studies indicate substantial differences in the right vs. left ventricular contraction force or expression of cardiac markers of stress and metabolism [41,42]. Our study documents that in the female rat heart, mitochondrial respiration linked to fatty acid oxidation decreases with age in both ventricles as does the capacity of the Complex IV. In the male heart, P_{FAO} and $P_{FAO+I+II}$ remained stable over all ages studied and Complex IV capacity decreased at the age of 24 months, which is in line with spectrophotometric analyses [13]. Interestingly, individual respirometric parameters did not significantly differ between the right and left ventricle, although a general trend towards the lower values in the right

ventricle could be observed.

Mitochondrial dysfunction is frequently taken as a culprit in many neurodegenerative diseases that are associated with advanced age [43]. Thus, relatively many studies on age-dependent changes in mitochondrial respiration and/or activities of mitochondrial enzymes in rodents [44,45] are available. Nevertheless, they are in majority focused only on male population and deal with various parts of the brain, which makes them difficult to compare. In the study performed on male rats aged 4, 12 and 20 months, a continuous declining trend of oxygen consumption was observed in mitochondria isolated from hippocampus in the respiratory states linked to Complex I, where malate and glutamate were used as substrates and Complex II was stimulated with succinate [44]. Our respirometric protocol was slightly different: we used homogenized tissue and combination of malate, pyruvate and glutamate as substrates carrying electrons to the Complex I that was followed by addition of succinate to reach the OXPHOS capacity when both complexes are saturated. We have not revealed really substantially declining trend in mitochondrial respiration, although significant differences were noted between the ages 12 and 24 months in P_{I+II} in both sexes and C_{IV} in the male rats. However, values obtained from 24-month-old rats were not different from those measured in 6-month-old animals.

A slightly different pattern was observed in the cerebellum, where mitochondrial respiration linked to Complex I was significantly lower at the age of 24 months when compared to age categories of 6 and 12 months in both sexes. The same trend was revealed in $OXPHOS_{I+II}$ capacities, although the significance was reached only between 12- and 24-month-old animals of both sexes. The mitochondrial dysfunction of hippocampus is widely reported to be linked to various cognitive and mood disorders, whereas that of cerebellum to motor learning, regulation of balance and muscle coordination [46]. The age of 24 months in rats is usually compared to the human age around 60 years, when cognitive deficits cannot be taken as a general feature across the whole population, but muscle coordination could be already impaired, in particular in sedentary individuals [47].

The pattern of age-related changes in mitochondrial respiration in parenchymatous organs, i.e. liver and kidney, differed substantially in our study. Declining trend could be observed in kidneys, in particular in parameters P_{FAO} and P_{FAO+I}. The decrease was more pronounced in female rats resulting in significant difference between males and females at the age of 12 months. Our results are in good agreement with previously published research on rat isolated mitochondria or homogenized tissue [12,48]. In the liver, mitochondrial respiration in states P_{FAO+I} and $P_{FAO+I+II}$ was significantly higher in females than in males and P_{FAO} reached the highest values in males aged 24 months. The reports on impact of aging on the liver mitochondrial oxygen consumption are relatively rare showing either decrease of mitochondrial respiration in senescent animals [10,11,49] or no age-related changes [13]. Pandya *et al.* reported even an increase in mitochondrial oxygen consumption in the aged rat liver [50]. Interestingly, Justo *et al.* [51] documented significant gender-dependent differences in the morphology and function of the rat liver mitochondria.

In conclusion, the results of our study indicate that the concept of a general pattern of age-dependent decline in mitochondrial functions across different organs and tissues could be misleading. Also the statement of a higher mitochondrial respiration in females [52] seems to be conflicting, since the gender-related differences may vary with the tissue studied, combination of substrates used and might be better detectable at younger ages than in old animals.

Acknowledgements

This research was funded by the project of the Grant Agency of the Charles University No. 966120, the Charles University Cooperation Program (research area Immunity and Infection), project No. Z.02.1.01/0.0/0.0/16_019/0000787 Fighting Infectious Diseases awarded by the MEYS CR, financed from EFRR, and the Specific Student Research Project Nr. 260538/2020 of the Charles University.

Conflict of Interest

There is no conflict of interest.

References

1. Anton SD, Woods AJ, Ashizawa T, Barb D, Buford TW, Carter CS, Clark DJ, ET AL. Successful aging: Advancing the science of physical independence in older adults. Ageing Res Rev 2015;24:304-327. https://doi.org/10.1016/j.arr.2015.09.005

2. Jang JY, Blum A, Liu J, Finkel T. The role of mitochondria in aging. J Clin Invest 2018;128:3662-3670. https://doi.org/10.1172/JCI120842
3. Son JM, Lee C. Mitochondria: multifaceted regulators of aging. BMB Rep 2019;52:13-23. https://doi.org/10.5483/BMBRep.2019.52.1.300
4. Son JM, Lee C. Aging: All roads lead to mitochondria. Semin Cell Dev Biol 2021;116:160-168. https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2021.02.006
5. Weber TA, Reichert AS. Impaired quality control of mitochondria: aging from a new perspective. Exp Gerontol 2010;45:503-511. https://doi.org/10.1016/j.exger.2010.03.018
6. Zhou KI, Pincus Z, Slack FJ. Longevity and stress in Caenorhabditis elegans. Aging (Albany NY) 2011;3: 733-753. https://doi.org/10.18632/aging.100367
7. Chabi B, Ljubicic V, Menzies KJ, Huang JH, Saleem A, Hood DA. Mitochondrial function and apoptotic susceptibility in aging skeletal muscle. Aging Cell 2008;7:2-12. https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2007.00347.x
8. Martin C, Dubouchaud H, Mosoni L, Chardigny JM, Oudot A, Fontaine E, Vergely C, ET AL. Abnormalities of mitochondrial functioning can partly explain the metabolic disorders encountered in sarcopenic gastrocnemius. Aging Cell 2007;6:165-177. https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2007.00271.x
9. Distefano G, Standley RA, Dubé JJ, Carnero EA, Ritov VB, Stefanovic-Racic M, Toledo FG, Piva SR, Goodpaster BH, Coen PM. Chronological age does not influence ex-vivo mitochondrial respiration and quality control in skeletal muscle. J Gerontol A Biol Sci Med Sci 2017;72:535-542. https://doi.org/10.1093/gerona/glw102
10. Ventura B, Genova ML, Bovina C, Formiggini G, Lenaz G. Control of oxidative phosphorylation by Complex I in rat liver mitochondria: implications for aging. Biochim Biophys Acta 2002;1553:249-260. https://doi.org/10.1016/S0005-2728(01)00246-8
11. Navarro A, Boveris A. Rat brain and liver mitochondria develop oxidative stress and lose enzymatic activities on aging. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 2004;287:1244-1249. https://doi.org/10.1152/ajpregu.00226.2004
12. Pokkunuri I, Ali Q, Asghar M. Grape powder improves age-related decline in mitochondrial and kidney functions in Fischer 344 rats. Oxid Med Cell Longev 2016;2016:6135319. https://doi.org/10.1155/2016/6135319
13. Kwong LK, Sohal RS. Age-related changes in activities of mitochondrial electron transport complexes in various tissues of the mouse. Arch Biochem Biophys 2000;373:16-22. https://doi.org/10.1006/abbi.1999.1495
14. Petrus AT, Lighezan DL, Danila MD, Duicu OM, Sturza A, Muntean DM, Ionita I. Assessment of platelet respiration as emerging biomarker of disease. Physiol Res 2019;68:347-363. https://doi.org/10.33549/physiolres.934032
15. Jedlička J, Kunc R, Kuncová J. Mitochondrial respiration of human platelets in young adult and advanced age - Seahorse or O2k? Physiol Res 2021;70:369-379. https://doi.org/10.33549//physiolres.934812
16. Lenaz G, Bovina C, Castelluccio C, Fato R, Formiggini G, Genova ML, Marchetti M, Pich MM, Pallotti F, Parenti Castelli G, Biagini G. Mitochondrial complex I defects in aging. Mol Cell Biochem 1997;174:329-333. https://doi.org/10.1023/A:1006854619336
17. Pesta D, Gnaiger E. High-resolution respirometry: OXPHOS protocols for human cells and permeabilized fibers from small biopsies of human muscle. Methods Mol Biol 2012;810:25-58. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-382-0_3
18. Braganza A, Corey CG, Santanasto AJ, Distefano G, Coen PM, Glynn NW, Nouraie SM, Goodpaster BH, Newman AB, Shiva S. Platelet bioenergetics correlate with muscle energetics and are altered in older adults. JCI Insight 2019;5:e128248. https://doi.org/10.1172/jci.insight.128248
19. Tyrrell DJ, Bharadwaj MS, Jorgensen MJ, Register TC, Molina AJ. Blood cell respirometry is associated with skeletal and cardiac muscle bioenergetics: Implications for a minimally invasive biomarker of mitochondrial health. Redox Biol 2016;10:65-77. https://doi.org/10.1016/j.redox.2016.09.009
20. Wu YS, Liang S, Li DY, Wen JH, Tang JX, Liu HF. Cell cycle dysregulation and renal fibrosis. Front Cell Dev Biol 2021;9:714320. https://doi.org/10.3389/fcell.2021.714320
21. Holmes DJ. F344 Rat. Sci Aging Knowl Env 2003;36:as2-as2. https://doi.org/10.1126/sageke.2003.36.as2

22. Colom B, Alcolea MP, Valle A, Oliver J, Roca P, García-Palmer FJ. Skeletal muscle of female rats exhibit higher mitochondrial mass and oxidative-phosphorylative capacities compared to males. Cell Physiol Biochem 2007;19:205-212. https://doi.org/10.1159/000099208
23. Farhat F, Amérand A, Simon B, Guegueniat N, Moisan C. Gender-dependent differences of mitochondrial function and oxidative stress in rat skeletal muscle at rest and after exercise training. Redox Rep 2017;22:508-514. https://doi.org/10.1080/13510002.2017.1296637
24. Gómez-Pérez Y, Amengual-Cladera E, Català-Niell A, Thomàs-Moyà E, Gianotti M, Proenza AM, Lladó I. Gender dimorphism in high-fat-diet-induced insulin resistance in skeletal muscle of aged rats. Cell Physiol Biochem 2008;22:539-548. https://doi.org/10.1159/000185538
25. Hepple RT. Mitochondrial involvement and impact in aging skeletal muscle. Front Aging Neurosci 2014;6:211. https://doi.org/10.3389/fnagi.2014.00211
26. Picard M, Ritchie D, Thomas MM, Wright KJ, Hepple RT. Alterations in intrinsic mitochondrial function with aging are fiber type-specific and do not explain differential atrophy between muscles. Aging Cell 2011;10:1047-1055. https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2011.00745.x
27. Crescenzo R, Bianco F, Mazzoli A, Giacco A, Liverini G, Iossa S. Skeletal muscle mitochondrial energetic efficiency and aging. Int J Mol Sci 2015;16:10674-10685. https://doi.org/10.3390/ijms160510674
28. Larsen RG, Callahan DM, Foulis SA, Kent-Braun JA. Age-related changes in oxidative capacity differ between locomotory muscles and are associated with physical activity behavior. Appl Physiol Nutr Metab 2012;37:88-99. https://doi.org/10.1139/h11-135
29. Esselun C, Dilberger B, Silaidos CV, Koch E, Schebb NH, Eckert GP. A walnut diet in combination with enriched environment improves cognitive function and affects lipid metabolites in brain and liver of aged NMRI mice. Neuromolecular Med 2021;23:140-160. https://doi.org/10.1007/s12017-020-08639-7
30. Brierly EJ, Johnson MA, Bowman A, Ford GA, Subhan F, Reed JW, James OF, Turnbull DM. Mitochondrial function in muscle from elderly athletes. Ann Neurol 1997;41:114-116. https://doi.org/10.1002/ana.410410120
31. Junker A, Wang J, Gouspillou G, Ehinger JK, Elmér E, Sjövall F, Fisher-Wellman KH, Neufer PD, Molina AJA, Ferrucci L, Picard M. Human studies of mitochondrial biology demonstrate an overall lack of binary sex differences: A multivariate meta-analysis. FASEB J 2022;36:e22146. https://doi.org/10.1096/fj.202101628R
32. Lalia AZ, Dasari S, Robinson MM, Abid H, Morse DM, Klaus KA, Lanza IR. Influence of omega-3 fatty acids on skeletal muscle protein metabolism and mitochondrial bioenergetics in older adults. Aging (Albany NY) 2017;9:1096-1129. https://doi.org/10.18632/aging.101210
33. Fišar Z, Hroudová J, Hansíková H, Spáčilová J, Lelková P, Wenchich L, Jirák R, Zvěřová M, Zeman J, Martásek P, Raboch J. Mitochondrial Respiration in the Platelets of Patients with Alzheimer's Disease. Curr Alzheimer Res 2016;13:930-941. https://doi.org/10.2174/1567205013666160314150856
34. Hedges CP, Woodhead JST, Wang HW, Mitchell CJ, Cameron-Smith D, Hickey AJR, Merry TL. Peripheral blood mononuclear cells do not reflect skeletal muscle mitochondrial function or adaptation to high-intensity interval training in healthy young men. J Appl Physiol (1985) 2019;126:454-461. https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00777.2018
35. Rose S, Carvalho E, Diaz EC, Cotter M, Bennuri SC, Azhar G, Frye RE, Adams SH, Børsheim E. A comparative study of mitochondrial respiration in circulating blood cells and skeletal muscle fibers in women. Am J Physiol Endocrinol Metab 2019;317:503-512. https://doi.org/10.1152/ajpendo.00084.2019
36. Sjövall F, Morota S, Hansson MJ, Friberg H, Gnaiger E, Elmér E. Temporal increase of platelet mitochondrial respiration is negatively associated with clinical outcome in patients with sepsis. Crit Care 2010;14:214. https://doi.org/10.1186/cc9337
37. Ehinger JK, Morota S, Hansson MJ, Paul G, Elmér E. Mitochondrial dysfunction in blood cells from amyotrophic lateral sclerosis patients. J Neurol 2015;262:1493-1503. https://doi.org/10.1007/s00415-015-7737-0
38. No MH, Heo JW, Yoo SZ, Kim CJ, Park DH, Kang JH, Seo DY, Han J, Kwak HB. Effects of aging and exercise training on mitochondrial function and apoptosis in the rat heart. Pflugers Arch 2020;472:179-193. https://doi.org/10.1007/s00424-020-02357-6

39. Khalifa AR, Abdel-Rahman EA, Mahmoud AM, Ali MH, Noureldin M, Saber SH, Mohsen M, Ali SS. Sex-specific differences in mitochondria biogenesis, morphology, respiratory function, and ROS homeostasis in young mouse heart and brain. Physiol Rep 2017;5:e13125. https://doi.org/10.14814/phy2.13125
40. Sanz A, Hiona A, Kujoth GC, Seo AY, Hofer T, Kouwenhoven E, Kalani R, Prolla TA, Barja G, Leeuwenburgh C. Evaluation of sex differences on mitochondrial bioenergetics and apoptosis in mice. Exp Gerontol 2007;42:173-182. https://doi.org/10.1016/j.exger.2006.10.003
41. Švíglerová J, Kuncová J, Nalos L, Holas J, Tonar Z, Rajdl D, Stengl M. Cardiac remodeling in rats with renal failure shows interventricular differences. Exp Biol Med (Maywood) 2012;237:1056-1067. https://doi.org/10.1258/ebm.2012.012045
42. Havlenova T, Skaroupkova P, Miklovic M, Behounek M, Chmel M, Jarkovska D, Sviglerova J, ET AL. Right versus left ventricular remodeling in heart failure due to chronic volume overload. Sci Rep 2021;11:17136. https://doi.org/10.1038/s41598-021-96618-8
43. Wang Y, Xu E, Musich PR, Lin F. Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases and the potential countermeasure. CNS Neurosci Ther 2019;25:816-824. https://doi.org/10.1111/cns.13116
44. Navarro A, López-Cepero JM, Bández MJ, Sánchez-Pino MJ, Gómez C, Cadenas E, Boveris A. Hippocampal mitochondrial dysfunction in rat aging. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 2008;294:501-509. https://doi.org/10.1152/ajpregu.00492.2007
45. Popa-Wagner A, Sandu RE, Cristin C, Uzoni A, Welle KA, Hryhorenko JR, Ghaemmaghami S. Increased degradation rates in the components of the mitochondrial oxidative phosphorylation chain in the cerebellum of old mice. Front Aging Neurosci 2018;10:32. https://doi.org/10.3389/fnagi.2018.00032
46. Tichanek F, Salomova M, Jedlicka J, Kuncova J, Pitule P, Macanova T, Petrankova Z, Tuma Z, Cendelin J. Hippocampal mitochondrial dysfunction and psychiatric-relevant behavioral deficits in spinocerebellar ataxia 1 mouse model. Sci Rep 2020;10:5418. https://doi.org/10.1038/s41598-020-62308-0
47. Tieland M, Trouwborst I, Clark BC. Skeletal muscle performance and ageing. J Cachexia Sarcopenia Muscle 2018;9:3-19. https://doi.org/10.1002/jcsm.12238
48. O'Toole JF, Patel HV, Naples CJ, Fujioka H, Hoppel CL. Decreased cytochrome c mediates an age-related decline of oxidative phosphorylation in rat kidney mitochondria. Biochem J 2010;427:105-112. https://doi.org/10.1042/BJ20091373
49. Reijne AC, Ciapaite J, van Dijk TH, Havinga R, van der Zee EA, Groen AK, Reijngoud D-J, ET AL. Whole-body vibration partially reverses aging-induced increases in visceral adiposity and hepatic lipid storage in mice. PLoS One 2016;11:e0149419. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0149419
50. Pandya JD, Valdez M, Royland JE, MacPhail RC, Sullivan PG, Kodavanti PRS. Age- and organ-specific differences in mitochondrial bioenergetics in Brown Norway Rats. J Aging Res 2020;2020:7232614. https://doi.org/10.1155/2020/7232614
51. Justo R, Boada J, Frontera M, Oliver J, Bermúdez J, Gianotti M. Gender dimorphism in rat liver mitochondrial oxidative metabolism and biogenesis. Am J Physiol Cell Physiol 2005;289:372-378. https://doi.org/10.1152/ajpcell.00035.2005
52. Ventura-Clapier R, Moulin M, Piquereau J, Lemaire C, Mericskay M, Veksler V, Garnier A. Mitochondria: a central target for sex differences in pathologies. Clin Sci (Lond) 2017;131:803-822. https://doi.org/10.1042/CS20160485

Patofyziologie Alzheimerovy choroby – historie, současnost, kontroverze

Pathophysiology of Alzheimer's disease – history, current view, controversies

Radovan Kunc[1,2], Jan Jedlička[3,4], Jitka Kuncová[3,4]
[1]*Hospic svatého Lazara, Plzeň, Česká republika*
[2]*Ústav sociálního a posudkového lékařství, Lékařská fakulta, Univerzita Karlova, Plzeň, Česká republika*
[3]*Ústav fyziologie, Lékařská fakulta, Univerzita Karlova, Plzeň, Česká republika*
[4]*Biomedicínské centrum, Lékařská fakulta, Univerzita Karlova, Plzeň, Česká republika*

SOUHRN

Alzheimerova choroba (AD) je nejčastější příčinou demence a významně se podílí na celkové morbiditě a mortalitě v populaci, zejména u seniorů. AD rozdělujeme na geneticky podmíněnou a sporadickou, které se liší etiopatogenezí, četností výskytu i průběhem. Sporadická forma AD představuje 99 % případů onemocnění. Její etiologie je komplexní a do velké míry zůstává neobjasněna; pravděpodobně se jedná o souhru mnoha endogenních a exogenních faktorů. V práci je podán základní přehled hypotéz vysvětlujících vznik a progresi AD s důrazem na nejrozšířenější amyloidovou hypotézu, která za klíčový faktor považuje nepřiměřenou tvorbu nebo nedostatečné odstraňování toxických forem amyloidových peptidů z amyloidového prekurzorového proteinu. Další teorie vzniku AD se přiklánějí k primárnímu působení jiných činitelů, např. tau proteinu, nepřiměřeného působení některých mediátorů, metabolických, neurovaskulárních, zánětlivých, infekčních a jiných faktorů. Práce také shrnuje některé kontroverzní závěry o patofyziologii choroby, které patrně pramení z obecné aplikace poznatků získaných výzkumem rozdílných forem choroby a přímé translace výsledků výzkumu na experimentálních modelech AD na lidské onemocnění. Navzdory obrovskému pokroku ve výzkumu AD nebyla dosud nalezena kauzální léčba.
Klíčová slova: Alzheimerova choroba, formy, patofyziologie, hypotézy vzniku, komplexní hypotéza

SUMMARY

Alzheimer´s disease (AD) is the most common cause of dementia and contributes significantly to overall morbidity and mortality in the population. Despite the global and social importance of AD and dementia, despite extensive research, the etiopathogenetic mechanisms associated with AD have not yet been fully elucidated. The disease can be divided into early onset or familial AD and sporadic or late onset AD, which differ in etiopathogenesis, prevalence, course, and genetic predisposition. The sporadic form of AD represents 99% of cases of the disease. Its etiology is complex and largely unclear; it probably results from an interplay of many endogenous and exogenous factors. The present article provides a basic overview of hypotheses explaining the origin and progress of AD with emphasis on the most common amyloid hypothesis regarding excessive synthesis or insufficient clearance of toxic forms of amyloid peptides as the key factor of AD pathophysiology. Other theories tend to explain AD development by the primary impact of other factors, such as tau protein, the inappropriate effects of some neurotransmitters, metabolic, neurovascular, inflammatory, infectious, and other factors. The article also summarizes some controversial conclusions on the pathophysiology of the disease, which probably stem from the general application of knowledge gained in the research on different forms of the disease and direct translation of research results on experimental models of AD to human disease. Despite enormous advances in AD research, causal treatment of this devastating disease has not yet been found.
Key words: Alzheimer´s disease, forms, pathophysiology, hypotheses of origin, complex hypothesis

ÚVOD

Alzheimerova choroba (AD – Alzheimer's disease, nověji se také používá termín Alzheimer's disease continuum; Aisen et al., 2017), je nejčastější příčinou kognitivní poruchy a spolu s ostatními příčinami syndromu demence se významně podílí na celkové morbiditě a mortalitě v populaci, zejména u seniorů. Fenomén stárnutí populace její prevalenci a význam dále zvyšuje, neboť věk je statisticky nejvýznamnějším rizikovým faktorem vzniku AD (Guerreiro a Bras, 2015). Přesné údaje o výskytu syndromu demence v ČR nemáme, podle odhadů České alzheimerovské společnosti (ČALS), které vycházejí z evropských a světových prací, se v roce 2015 jednalo o více než 150 000 nemocných v ČR a celosvětově téměř o 47 milionů nemocných (Mátl a Mátlová, 2015). Z tohoto počtu je více než 50 % případů (platí pro ČR) diagnostikováno pozdě – ve středním až těžkém stadiu demence (Vyhnálek et al., 2011). Odhaduje se, že každých dvacet let se počet nemocných zhruba zdvojnásobí. V roce 2050 tedy očekáváme celosvětově přes 130 milionů lidí trpících syndromem demence (Mátl a Mátlová, 2015).

Mezi příčinami syndromu demence dominují primární neurodegenerativní choroby v čele s AD, která je etiopatogenetickým činitelem asi v 70 % případů u všech nemocných s tímto syndromem. Zbytek zahrnují ostatní proteinopatie (neurodegenerativní demence s patologickými depozity proteinů v mozku; např. demence s Lewyho tělísky nebo frontotemporální demence aj.), které též řadíme mezi

primární příčiny, a řada sekundárních příčin, mezi nimiž je v popředí vaskulární etiologie. U velké části nemocných se etiopatogenetické jednotky kombinují (Jirák a Laňková, 2007; Pidrman, 2007).

Klinicky se jedná o progresivní a ireverzibilní proces charakterizovaný plíživou a globální deteriorací mozkových funkcí, který se projevuje zpočátku zejména poruchami kognice a později i postižením nekognitivních funkcí a behaviorálními a psychologickými symptomy a který nezadržitelně vede ke ztrátě soběstačnosti a v konečném důsledku ke smrti (Pidrman, 2007).

Přes uvedené skutečnosti svědčící o zásadním významu AD pro celou populaci trvá určitá diagnostická a zejména terapeutická bezradnost. Ta je do velké míry dána trvajícím nedokonalým poznáním etiopatogenetických procesů spojených s AD.

FORMY AD

Alzheimerovu chorobu rozdělujeme na geneticky podmíněnou a sporadickou, které se liší etiopatogenezí, četností výskytu i průběhem. Prvním typem je autozomálně-dominantně dědičná AD (ADAD; též familiární AD, early-onset AD), jejíž determinující příčinou jsou mutace v jednom ze tří genů kódujících proteiny účastnící se metabolismu β-amyloidu – prekurzorový protein amyloidu (APP), presenilin 1 (PSEN1) nebo presenilin 2 (PSEN2) (Bateman et al., 2011; Hane et al., 2017). Reprezentuje méně než 1 % ze všech případů a obvykle začíná dříve a rychleji progreduje do terminálních fází (Hane et al., 2017; Swearer et al., 1996).

Druhým typem je sporadická forma (SAD). Etiologie této četnější formy je komplexní a do velké míry zůstává neobjasněna (Aisen et al., 2017). Pravděpodobně se jedná o souhru mnoha endogenních genetických a exogenních faktorů (Lane et al., 2018). Genetické predispozici se připisuje zhruba 70 % vlivu. Nejvýznamnějším genetickým rizikovým faktorem je polymorfní gen kódující apolipoprotein E, nacházející se na 17. chromozomu, respektive jeho e4 izoforma. Oproti nositelům alel e2 a e3 má heterozygotní nosič izoformy e4 přibližně trojnásobně zvýšené riziko výskytu AD, u homozygotů riziko stoupá dokonce dvanáctkrát (Verghese et al., 2011). Nepochybná je asociace se vzrůstajícím věkem. Zatímco do 65 let věku je výskyt AD spíše vzácností, nad 65 let jde o každého 13. člověka, nad 90 let pak o téměř každého druhého. Dalším rizikovým faktorem je ženské pohlaví, což zřejmě částečně souvisí s vyšší průměrnou délkou dožití u žen – cca 82 let v ČR (Mátl a Mátlová, 2015). Popsána a diskutována je celá řada dalších endogenních a exogenních více či méně významných rizikových faktorů (kouření, alkohol, arteriální hypertenze, diabetes mellitus, nadváha a obezita, nízký socioekonomický status) i protektivních faktorů (např. přiměřená fyzická a duševní aktivita, terapie statiny při dyslipidemii aj.) (Povova et al., 2012). Jejich výčet však není předmětem tohoto přehledu a významnost bývá často diskutabilní. Pro příklad lze uvést zpochybnění významu obezity, kdy se v rozsáhlé britské retrospektivní analýze naopak jako významný rizikový faktor ukázala podvýživa (Qizilbash et al., 2015).

HISTOPATOLOGICKÉ ZNÁMKY

Dva nejdůležitější morfologické rysy AD jsou extracelulární depozita amyloidu beta (Aβ; miliární tělíska, alzheimerovské plaky) a intracelulární neurofibrilární klubíčka (neurofibrillary tangles, NFT) tvořená hyperfosforylovaným tau proteinem (viz dále). Mezi další neuropatologické známky můžeme řadit tzv. vlákna neuropilu (neuropil threads), dystrofické presynaptické axony v okolí depozit beta amyloidu, aktivaci mikroglií, astrogliózu a cévní amyloidní dystrofii. Nevyhnutelným důsledkem těchto změn je proces neurodegenerace (Lane et al., 2018; Serrano-Pozo et al., 2011).

Depozita Aβ jsou lokalizována především v neokortexu, až v pozdějších fázích choroby se šíří do subkortikálních struktur (Lane et al., 2018). Jsou tvořena z peptidů Aβ (AβP), kterými rozumíme především monomery o 40 (Aβ40) a 42 (Aβ42) aminokyselinách, které jsou tvořeny z APP i v průběhu „normálního stárnutí". Funkce Aβ peptidů je nejasná, jednou z možností je modulace synaptické aktivity neuronů. U AD je jejich tvorba extenzivní a za dosud nevyjasněných podmínek agregují v toxické oligomery a dále v amyloidové plaky (Hardy a Higgins, 1992).

Neurofibrilární klubíčka (NFT) jsou intraneuronální depozita, která jsou lokalizována zpočátku v entorhinálním kortexu a hipokampu, až později se šíří do oblastí asociační kůry. Jejich podkladem je patologie proteinu tau, který je za fyziologických okolností vázán na mikrotubuly axonální části neuronu a má stabilizační funkci. U AD dochází k hyperfosforylaci a změně polohy tau do somatodendritické části neuronu. Tento proces pozvolna vede ke zhroucení cytoarchitektoniky neuronu a jeho apoptóze. Na místech původně vitálních neuronů nacházíme tzv. „ghost tangles". NFT lépe korelují s tíží klinického postižení (Serrano-Pozo et al., 2011).

Makroskopickým znakem AD je mozková atrofie (nejlépe hodnotitelná pomocí strukturální magnetické rezonance). Nejedná se o dostatečně specifickou a senzitivní známku, avšak může být diagnosticky cenná. Globální atrofie mozku je znakem vyloženě nespecifickým, vyskytujícím se jak u normálního stárnutí, tak u demencí. Některé lokalizované podtypy atrofie však mohou přinést cennou informaci o základní patologii. U AD se jedná zejména o hipokampální a parieto-temporální atrofii. Nicméně i takové nálezy je nutno hodnotit v klinickém kontextu jednotlivých pacientů a jejich věku (Harper et al., 2014).

HYPOTÉZY VZNIKU A ROZVOJE AD V HISTORICKÝCH SOUVISLOSTECH

S trochou nadsázky lze tvrdit, že za více než sto let od prvních prací Aloise Alzheimera a Oskara Fischera v roce 1907 (Goedert, 2009; Strassnig a Ganguli, 2005) nedošlo k zásadnímu průlomu v náhledu na nemoc, které se dnes říká Alzheimerova choroba. Alzheimer ve své původní práci píše (přeloženo volně z anglického překladu Strassniga a Ganguliho): *„ ...je možné pozorovat velmi podivné změny neurofibril... přes celou kůru mozkovou a zejména ve svrchních vrstvách se nacházejí miliární tělíska, která*

jsou tvořena depozicí podivné hmoty." Zhruba těmito slovy popsal základní patologické známky AD v mozkové tkáni, kolem kterých se již více než sto let vědci snaží vytvořit funkční komplexní teorii o etiologii a patogenezi AD. Dlouho však byla AD považována za vzácně se vyskytující chorobu a byla jí věnována minimální pozornost (Goedert, 2009). Průlom nastal v roce 1976, kdy Katzman prokázal, že AD a tzv. senilní demence by měly být považovány za jednu a tutéž chorobu, což z původně vzácné presenilní AD rázem učinilo čtvrtou až pátou nejčastější příčinu smrti ve Spojených státech amerických (Katzman, 1976).

V roce 1976 zároveň Davies a Maloney prokázali signifikantní úbytek cholinergních neuronů v nucleus basalis Meynerti v mozku zemřelých pacientů trpících AD oproti kontrolnímu vzorku (Davies a Maloney, 1976). Na podkladě této práce, dalších podobných objevů a průkazu role acetylcholinu v paměťových funkcích byla v roce 1982 navržena jedna z prvních hypotéz vzniku AD – cholinergní hypotéza (Francis et al., 1999). Stanovila, že degenerace cholinergních neuronů v bazálním předním mozku a související úbytek cholinergní neurotransmise v mozkové kůře a dalších oblastech mozku významně přispívají ke kognitivní dysfunkci u pacientů s AD (Bartus et al., 1982). Postupem času zájem o cholinergní hypotézu ochladl, nicméně stále zůstává podkladem pro jedinou, alespoň částečně účinnou léčbu AD (inhibitory acetylcholinesterázy – donepezil, rivastigmin, galantamin) spolu s memantinem, inhibitorem glutamátergních NMDA receptorů (Bohnen et al., 2018; Franková, 2015).

Chromatografický nález APP a jeho genu (Glenner a Wong, 1984; Kang et al., 1987; Masters et al., 1985) umožnil formulaci amyloidové hypotézy v roce 1992, která dodnes zůstává nejpopulárnější teorií vzniku AD. Předpokládá, že depozice peptidů Aβ, hlavních komponent alzheimerovských plaků, je kauzálním činitelem alzheimerovské patologie a neurofibrilární klubíčka, vaskulární patologie, neurodegenerace a demence jsou důsledkem této depozice (Hardy a Higgins, 1992; Selkoe a Hardy, 2016). Terapeutické přístupy založené na amyloidové hypotéze však doposud selhaly (Cummings et al., 2019), což nevyhnutelně vedlo k pochybnostem o amyloidové hypotéze a tvorbě nových teorií, jako jsou např. tau hypotéza (2009), mitochondriální hypotéza (2004), metabolická hypotéza, neurovaskulární hypotéza, zánětlivá hypotéza, a další (Karran a De Strooper, 2016; Liu et al., 2019). Etiopatogeneze choroby však do velké míry zůstává nejasná (Du et al., 2018). Schematický přehled vývoje hypotéz vzniku a progrese AD v čase ukazuje **obr. 1**.

AMYLOIDOVÁ HYPOTÉZA

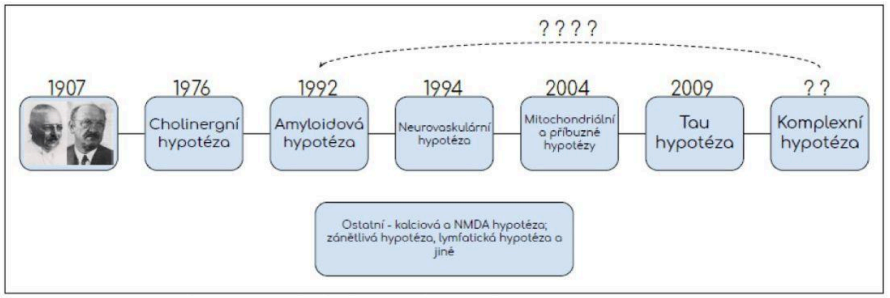
Je přes občasné kritické ohlasy stále nejvíce přijímanou teorií vysvětlující etiopatogenezi AD.

Na počátku kaskády vzniku a ukládání Aβ stojí APP, jehož exprimující gen se nachází na 21. chromozomu. Jedná se o transmembránový protein, který se vyskytuje ve třech izoformách podle počtu aminokyselin: APP695, APP751, APP770. V mozku se vyskytuje především izoforma APP695 (Chow et al., 2010; Zhang et al., 2011). APP je proteolyticky štěpen sekretázami na N-terminální fragmenty (obvykle označené APPα nebo β) a C-terminální fragmenty (CTF) amyloidogenní a neamyloidogenní cestou (**obr. 2**).

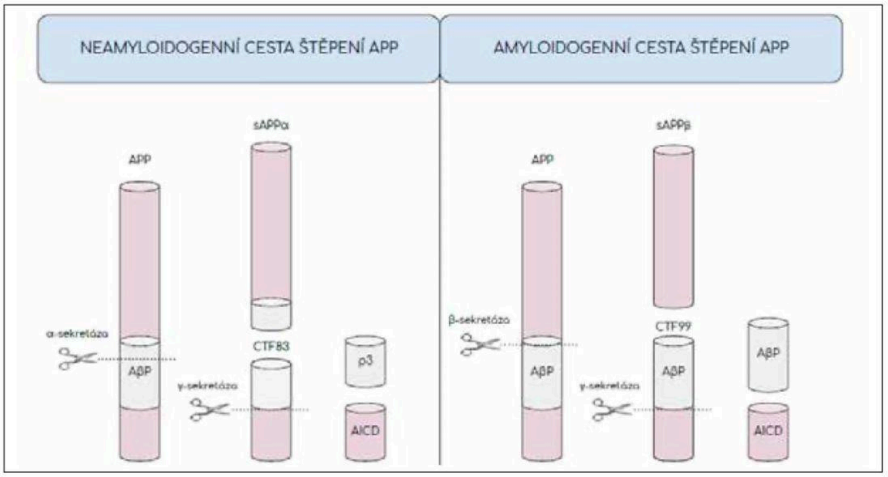
Neamyloidogenní cestu zajišťuje štěpení APP α-sekretázou a nevznikají při něm AβP, neboť vazebné místo pro α-sekretázu je v místě jeho sekvence. Vznikají molekuly sAPPα, které mají pravděpodobně roli v neurogenezi, a CTF83, jejichž fyziologická role je prozatím nejasná (Chow et al., 2010; Zhang et al., 2011).

V případě amyloidogenní cesty je APP primárně štěpen enzymem β-sekretázou (beta-site APP cleaving enzyme 1; BACE1) za vzniku molekul sAPPβ (N-terminální solubilní fragment) a CTF99 (C-terminální fragment). Produkt sAPPβ má fyziologický význam při maturaci CNS a periferní nervové soustavy, kdy se účastní řízené selektivní eliminace (angl. pruning) synapsí. V období dospělosti a především ve stáří může být tento efekt nežádoucí a přispívat k neurodegeneraci u AD (Nikolaev et al., 2009). Fyziologická úloha samotného CTF99 zůstává nejasná, je však prekurzorem Aβ (Chow et al., 2010).

AβP je podle amyloidové teorie centrem patogeneze AD. Jedná se o monomer o 38–43 aminokyselinách, který se převážně vyskytuje ve formě Aβ40, ale neméně důležitá je i forma Aβ42, která vykazuje vysoký amyloidogenní



***Obr. 1.**: Přehled vzniku hypotéz patofyziologie AD v čase. NMDA = N-metyl-D-aspartát, agonista glutamátového receptoru*



Obr. 2: *Neamyloidogenní a amyloidogenní štěpení prekurzorového proteinu amyloidu (APP) sAPPα = rozpustný N-terminální fragment APP, CTF = C-terminální fragment, p3 = neamyloidogenní fragment APP vznikající postupným štěpením α-sekretázou a γ-sekretázou, AICD = intracelulární doména APP, AβP = amyloidový peptid β*

potenciál. AβP vzniká štěpením CTF99 γ-sekretázou (Chow et al., 2010). Původně byly za toxickou formu Aβ považovány senilní plaky. Dnes se pozornost obrací zejména k oligomerům Aβ, které vykazují pravděpodobně nejvyšší toxický potenciál, což dokládá i studie Shankara et al. z roku 2008, při které byly extrahovány rozpustné oligomery Aβ od zemřelých pacientů s typickou AD a v pokusech na zdravých myších a potkanech byl prokázán jejich negativní efekt na dlouhodobou potenciaci neuronů, synaptické funkce, vyvolaly poškození dendritických trnů a zánik neuronů. Zároveň došlo ke zhoršení kognitivních funkcí, resp. vyhasínání dříve naučených schopností (Shankar et al., 2008). Oligomery AβP také indukují hyperfosforylaci tau-proteinu a degeneraci neuritů (Jin et al., 2011). Senilní plaky naopak mohou hrát roli jakéhosi protektivního rezervoáru (Selkoe a Hardy, 2016; Shankar et al, 2008). Z jedné studie post mortem bylo zjištěno, že senilní plaky zdravých jedinců, resp. těch kteří za života nevykazovali klinicky manifestní AD, obsahovaly signifikantně méně oligomerů Aβ než mozky postižených AD, což opět podporuje teorii o toxicitě oligomerů (Esparza et al., 2013).

ROLE TAU PROTEINU V AMYLOIDOVÉ HYPOTÉZE

Za klíčový bod v patogenezi AD se považuje iniciace tvorby neurofibrilárních klubíček (NFT), která vznikají na podkladě hyperfosforylace tau proteinu (Frost et al., 2009). Tau je intraneuronální protein, který za fyziologických okolností stabilizuje neuronální mikrotubuly, podporuje růst neuritů, transport organel a membránové interakce a podílí se na udržení cytoarchitektoniky buňky (MAPT – microtubule-associated protein tau; Sery et al., 2013). Vyskytuje se v 6 izoformách o délce 352 až 441 aminokyselin a strukturou připomíná kancelářskou sponku (Nizynski et al., 2017). Správnou funkci proteinu a jeho vazebnou schopnost určuje úroveň fosforylace (Iqbal et al., 2010; Wang a Liu, 2008). Při hyperfosforylaci tau dochází k jeho odpojení od mikrotubulů, jejichž transportní funkce je tím vážně narušena a tau vytváří agregáty NFT, které se prionovým způsobem šíří do dalších neuronů, kde vyvolávají poškození mitochondrií, dysregulaci metabolismu vápníku, aktivaci oxidativního vzplanutí, alteraci axonálního transportu a synaptickou dysfunkci. Tyto mechanismy jsou zodpovědné za neurotoxicitu, a tedy proces neurodegenerace (Ricciarelli a Fedele, 2017; Sharma et al., 2019). Přesná příčina hyperfosforylace tau není známa, neboť se na ní mohou podílet nejen kinázy a fosfatázy přímo ovlivňující počet fosfátových skupin navázaných na protein, ale také další enzymy důležité pro posttranslační modifikaci proteinů, např. glykosyltranferázy, které na serinové nebo threoninové zbytky navazují N-acetylglukosamin a brání tak jejich fosforylaci (Zhu et al., 2014).

Jedna z teorií předpokládá, že spouštěcím mechanismem pro hyperfosforylaci tau je Aβ, který stimuluje vstup vápníku do buněk, což vede k amplifikaci fosforylace tau proteinu a tvorbě párových helikálních filament (Hardy a Higgins, 1992). Propojení beta a tau patologie však zatím není plně objasněno, možné interakce jsou předpokládány na úrovni ApoE4, některých kináz nebo regulaci metabolismu železa (Liu et al., 2019).

MITOCHONDRIÁLNÍ A METABOLICKÁ HYPOTÉZA

Mitochondrie jsou semiautonomní organely, které kromě produkce ATP hrají nezastupitelnou roli v syntéze některých metabolitů, vápníkové homeostáze, regulaci apoptózy

a udržování membránového potenciálu. Jako vedlejší produkt při transportu elektronů vznikají v respiračním systému mitochondrií kyslíkové radikály, které mají pravděpodobně signální roli, ale v případě nepřiměřené produkce mohou poškozovat nejen mitochondriální, ale i další nitrobuněčné struktury. Mitochondrie také mají vlastní DNA, která se předává výhradně po mateřské linii a která kóduje některé mitochondriální proteiny, tRNA a rRNA.

Intenzivní výzkum v oblasti možného podílu mitochondrií na vzniku nebo progresi AD byl podnícen skutečností, že výskyt tohoto onemocnění je častější u žen než u mužů i při zohlednění věku nemocných. Dalším zajímavým ukazatelem bylo zjištění, že riziko vzniku demence se podstatně zvyšuje u potomků matek s AD než u dětí, jejichž otcové demencí také trpěli. To by mohlo znamenat, že mitochondriální geny a s nimi související funkce těchto organel by mohly hrát klíčovou úlohu v indukci nebo alespoň v rozvoji AD.

Od 70. let minulého století je známo, že abnormální morfologie a funkce mitochondrií je častým nálezem při analýze mozkové tkáně pacientů s AD i mnoha zvířecích modelů tohoto onemocnění (Johnson a Blum, 1970). V roce 1990 byla publikována první práce o snížené aktivitě cytochrom c oxidázy v destičkách pacientů s AD a později bylo prokázáno, že podobný defekt tohoto enzymu je typický také pro neurony i jiné buňky (Bosetti et al., 2002; Parker et al., 1990). V mozku pacientů trpících AD byla postupně prokázána řada dalších mitochondriálních enzymatických defektů – snížená aktivita i exprese enzymů Krebsova cyklu, pyruvátdehydrogenázy nebo ATP-syntázy, které často korelovaly s množstvím plaků (Abate et al., 2020). Byla také opakovaně zjištěna zvýšená četnost sporadických mutací mtDNA, jejíž příčinou je pravděpodobně oxidační stres vyvolaný dysfunkcí respiračních komplexů (Santos et al., 2013). Mitochondriální dysfunkce u AD však nespočívá jen v narušení procesů přímo spjatých s tvorbou ATP, ale také v poškození dalších významných funkcí regulujících množství těchto organel v buňce a dostupnost v synaptických zakončeních: fúze a štěpení mitochondrií, jejich biogeneze, autofagie a transport axonálními tubuly (Calkins a Reddy, 2011). Mnohé z těchto procesů závisí na funkčnosti kontaktních míst mezi membránami endoplazmatického retikula a mitochondrií, přes která dochází k výměně vápenatých iontů a lipidů zahájení procesu štěpení mitochondrií (Xu et al., 2020).

Komplexní teorie mitochondriálního původu AD byla publikována Swerdlowem a Khanem v roce 2004. Předpokládá, že základní energetická zdatnost mitochondrií je dána geneticky a ovlivňují ji jaderné i mitochondriální geny. Při stárnutí organismu dochází k poklesu mitochondriálních funkcí, který se při překročení schopnosti buňky tyto škody kompenzovat (prahu) projeví změnami funkcí těch tkání a orgánů, které jsou náročné na dodávku energie. Snížená schopnost respiračních komplexů přenášet elektrony směrem k molekulárnímu kyslíku vede nejen k nedostatečné syntéze ATP, ale také ke zvýšené produkci kyslíkových radikálů a následnému poškození mitochondriální DNA, změnám v buněčném hospodaření vápníkem a zhoršenému obratu mitochondrií v buňce, které energetický deficit dále prohlubují (Swerdlow a Khan, 2004).

Za významnou mitochondriální poruchu se u AD považuje narušený proces mitofagie, jejíž stimulace může experimentálně zvýšit fagocytózu plaků mikrogliemi a snížit hyperfosforylaci tau proteinu (Fang et al., 2019). Je však třeba poznamenat, že mnohé z mitochondriálních dysfunkcí popsaných u AD byly prokázány i u mnoha dalších primárních i sekundárních neurodegenerativních onemocnění (Pantiya et al., 2020).

Poměrně dlouho je známo, že v mozku pacientů trpících demencí dochází k významnému snížení utilizace glukózy (de Leon et al., 1983) a že snížený metabolický obrat mozkové tkáně může o mnoho let předcházet kognitivním poruchám. Z mnoha metabolitů byly v souvislosti s AD zkoumány nejvíce oxalacetát, alfa-ketoglutarát, fumarát a sukcinát, tj. meziprodukty Krebsova cyklu, a acetyl-CoA, ústřední molekula intermediárního metabolismu. Jsou nezbytné pro řádný průběh a regulaci metylace a acetylace DNA a histonů, tj. epigenetických procesů, jejichž intenzita je v mozku pacientů s AD snížena (Mastroeni et al., 2010).

OSTATNÍ HYPOTÉZY VZNIKU A PROGRESE AD

Z dalších možných mechanismů etiopatogeneze AD byla nejvíce zkoumána neurovaskulární hypotéza, která tvrdí, že primární změnou v mozku postiženém AD je narušená mikrocirkulace, která zhoršuje clearance AβP přes hematoencefalickou bariéru. AβP pak svými vazokonstrikčními účinky dále zhoršuje perfuzi mozku, hypoxii nervové tkáně, což vede k dysfunkci neuronů a demenci (Zlokovic, 2005). Snížené odstraňování Aβ z intersticiálního prostoru předpokládá také tzv. lymfatická, případně glymfatická hypotéza vzniku AD (Iliff et al., 2012).

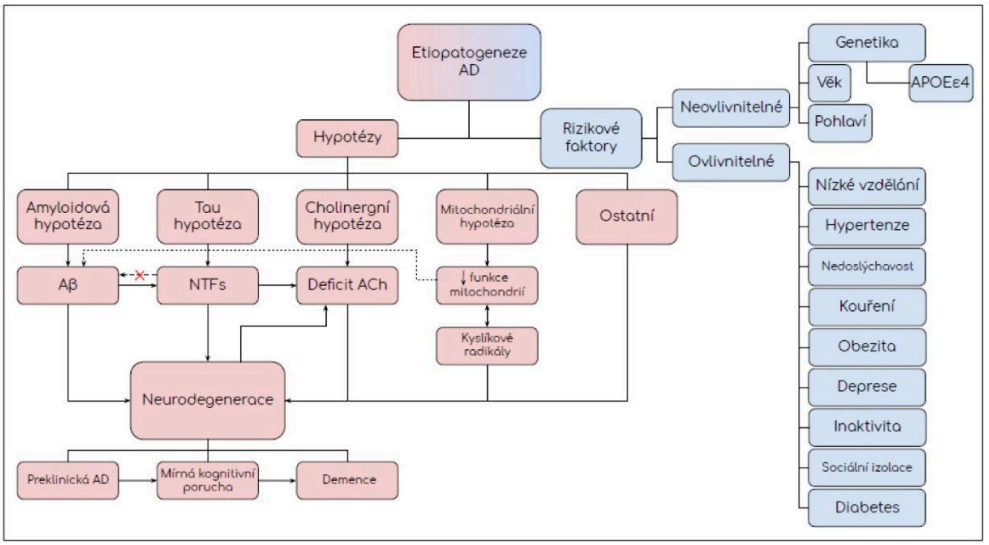
Zánětlivá hypotéza poukazuje na zvýšenou aktivitu mikroglií v mozku pacientů s AD, která je však pravděpodobně způsobena Aβ (Vandenabeele a Fiers, 1991). Další teorie připisují důležitou roli některým biogenním kovovým prvkům, zejména železu, zinku a mědi, které by mohly přispívat k agregaci Aβ nebo hypometabolismu mozkové tkáně (Karran a De Strooper, 2016; Liu et al., 2019).

Souhrnné schéma hypotetických příčin AD a rizikových faktorů vzniku onemocnění ukazuje **obr. 3**.

KONTROVERZE

Ačkoliv se Aβ jeví jako klíčový faktor v etiopatogenezi AD, dosavadní selhání vývoje kauzální léčby zaměřené na snížení tvorby amyloidogenních peptidů nebo na jejich odstranění vedou ke zpochybňování amyloidové hypotézy částí vědecké obce. Řada důkazů pro její platnost existuje, nicméně kritici upozorňují i na velké množství vědeckých prací, které amyloidovou hypotézu nepodporují (Ricciarelli a Fedele, 2017).

Nejsilněji je amyloidová hypotéza podpořena důkazy z genetického výzkumu. Autozomálně-dominantně dědičná AD (ADAD) je, jak již bylo řečeno, způsobena mutacemi v jednom ze tří genů, které kódují proteiny účastnící se metabolismu β-amyloidu – APP, PSEN1, PSEN2 (Bateman et al., 2011; Hane et al., 2017). Tyto mutace vedou k vystupňované



***Obr. 3**: Přehled nejvýznamnějších hypotetických příčinných činitelů vzniku AD, jejichž účinek umožňují nebo potencují další ovlivnitelné a neovlivnitelné rizikové faktory.*

produkci Aβ, depozici senilních plaků, progredující cerebrální amyloidové angiopatii a ke klinickému obrazu časně se projevivší demence. U pacientů s Downovým syndromem spojeným s trizomií 21. chromozomu, kde je lokalizován gen pro APP, rovněž dochází k nadprodukci Aβ a vzniku časné demence AD typu (Musiek a Holtzman, 2015). Zajímavostí je identifikace několika mutací APP způsobujících ADAD, které neovlivňují produkci Aβ peptidů, ale pouze jeho agregační vlastnosti nebo úroveň degradace (Goate et al., 1991; Tsubuki et al., 2003). Zároveň byla objevena vzácná mutace APP genu, která podmiňuje nižší produkci Aβ, čímž snižuje riziko rozvoje AD (Jonsson et al., 2012). Souhrnně lze tedy říci, že iniciální etiopatogenetický faktor ADAD je nadprodukce a/nebo snížená degradace Aβ, která úzce souvisí s rozvojem klinicky manifestní demence. Z tohoto poznání je vyvozováno, že i sporadická AD je iniciována nerovnováhou mezi produkcí a clearance Aβ, který pak spouští navazující patologické procesy. ADAD je nicméně extrémně vzácné onemocnění a možnost nekritické extrapolace důkazů na sporadickou formu AD je hojně diskutována a zpochybňována. Není jisté, zda obě jednotky sdílí společný etiopatogenetický základ (Ricciarelli a Fedele, 2017). Nelze ale opomenout, že i u SAD je prokázána souvislost s dysregulací metabolismu Aβ, resp. při přítomnosti apolipoproteinu ApoE4, který zpomaluje odbourávání a zvyšuje koncentraci Aβ v mozku, je riziko rozvoje SAD mnohonásobně vyšší (Verghese et al., 2011).

Dalším problémem je podle kritiků fakt, že většina znalostí o patofyziologii Aβ pochází z transgenních alzheimerovských myší, které podle některých ohlasů nepředstavují adekvátní modely pro výzkum AD u člověka (Ricciarelli a Fedele, 2017). Např. u standardně používané transgenní myši s vystupňovanou expresí APP se kognitivní a behaviorální změny vyskytují spíše jako přímý důsledek zvýšené exprese APP, který někdy ani není doprovázen významnou depozicí Aβ nebo se objevují již před ukládáním Aβ. Lidská AD však probíhá odlišně. Kognitivní pokles je pozorovatelný roky nebo spíše desetiletí po signifikantní depozici Aβ do senilních plaků a zároveň je spojen s rozvojem tau patologie. Kognitivní dysfunkce je u APP transgenních myší parciálně reverzibilní, což opět neodpovídá průběhu AD u člověka (Musiek **a** Holtzman, 2015). V roce 2014 byl vytvořen dokonalejší model APP transgenní myši, která vykazuje přirozenější a pozvolnější depozici senilních plaků bez nadměrné exprese APP. Slabinou je opět absence rozvoje tau patologie (Saito et al., 2014). Podrobnou analýzou transgenních alzheimerovských myších modelů se zabývá řada přehledových prací (Esquerda-Canals et al., 2017; Wirths a Zampar, 2020).

Dalším argumentem proti amyloidové hypotéze je neuropatologická disproporce mezi lokalizací ukládání Aβ a zánikem neuronů. Zatímco depozita Aβ se masivně objevují nejprve v parietální (konkrétně v lobulus parietalis superior) a frontální kůře, degenerace neuronů obvykle začíná v entorhinální kůře a hipokampu, tj. regionech s relativně malým počtem senilních plaků (Braak et al., 1999). Lokalizace neurodegenerace mnohem lépe odpovídá vývoji tau patologie (Serrano-Pozo et al., 2011). Někteří vědci věří, že amyloid a tau působí nezávisle, případně paralelně (Small a Duff, 2008). Převládá však teorie, která příléhavou metaforou v angličtině zní: „Aβ is the trigger and tau is the bullet" (Bloom, 2014). Popisuje Aβ patologii jako nadřazenou,

která předchází navazující procesy o řadu let a tau patologii jako výkonnou složku, která spouští další procesy vedoucí k progresi neurodegenerace (Selkoe a Hardy, 2016). Jak tedy dochází k iniciaci tau patologie pomocí vzdáleného beta-amyloidu? Jedno z možných vysvětlení může být šíření patologického procesu prionovým mechanismem, tj. indukcí konformačních změn u strukturálně intaktních proteinů pomocí již aberantního peptidu – v tomto případě konformačně alterovaného Aβ nebo tau, kde se předpokládá možnost transsynaptického přenosu. Dále je studováno zapojení imunitních mechanismů, včetně role aktivovaných mikroglií (Aguzzi a Rajendran, 2009; Jucker a Walker, 2013; Tatarnikova et al., 2015). Rozdílná lokalizace senilních plaků a NTF by mohla být tímto vysvětlena. Teorií je však více a propojení tau a Aβ patologie není zatím uspokojivě objasněno (Lane et al., 2018).

Kritici amyloidové hypotézy také poukazují na to, že existuje signifikantní procento lidí, kteří před svou smrtí netrpěli kognitivní poruchou, ale byla u nich prokázána významná depozice senilních plaků (Aizenstein et al., 2008), i když nelze vyloučit, že se jednalo o preklinickou fázi choroby, která by s odstupem let dospěla k symptomům. V dalších letech výzkumu věnovaného vztahu složení plaků a koncentrace různých forem AβP v lyzátech mozku se ukázalo, že důvodem může být menší ukládání toxických forem AβP do plaků kognitivně intaktních pacientů než u lidí s demencí. Senilní plaky tak mohou reprezentovat protektivní rezervoár a být nástrojem účinné sekvestrace toxických forem AβP (Esparza et al., 2013),

Za hlavní toxický prvek v Aβ kaskádě vzniku a progrese AD jsou dnes považovány rozpustné Aβ oligomery (Selkoe a Hardy, 2016). V jedné studii byla prokázána silná korelace mezi přítomností rozpustných forem Aβ a demencí s patologickými známkami AD. Podle výsledků jde o známku specifickou, která umožňuje účinně diferencovat Alzheimerovu chorobu s demencí, demenci nealzheimerovskou a kognitivně zdravého člověka (McDonald et al., 2010). Další studie prokázala přítomnost Aβ oligomerů v homogenátech mozku jen u pacientů s AD, naopak u kognitivně intaktních pacientů chyběly (Shankar et al., 2008). Důkazy podporující kauzální vliv Aβ oligomerů pocházejí především ze studií *post mortem* a *in vitro*. Někteří kritici se obávají, že nadějné výsledky výzkumu mohou být jen arteficiálním produktem současných experimentálních metod (Morris et al., 2014). Zájem o Aβ oligomery však logicky roste, pokračuje snaha o komplexní zmapování jejich působení (Huang a Liu, 2020).

Diskutabilní jsou také neuropatologické rozdíly v depozici u ADAD a SAD. Dokonce ani u SAD nedochází k depozici senilních plaků stereotypně (Thal et al. 2002). Podle některých pramenů až 50 % případů AD sdílí ještě minimálně jednu smíšenou patologii. Například depozita α-synukleinu, typická pro Parkinsonovu chorobu a demenci s Lewyho tělísky, se nacházejí u více než 50 % případů AD (Resende et al., 2013).

Ani výzkum ostatních hypotéz vzniku a progrese AD, zpočátku slibný, nevedl dosud k uspokojivému výstupu ve formě účinné terapie AD. Kromě látek zaměřených na tvorbu a odstraňování Aβ jsou v různých fázích preklinického a klinického výzkumu potenciální léky zaměřené na protein tau, stimulaci respirační aktivity mitochondrií, antioxidanty, stimulátory mitofagie a mitochondriální biogeneze, metabolity, protizánětlivé léky, antivirotika, nervové růstové faktory, léky snižující hladinu cholesterolu v krvi, léky interferující s uvolňováním nebo uptakem některých přenašečů vzruchu a mnoho jiných (Liu et al., 2019). V USA probíhá v současnosti téměř 60 klinických farmakologických studií zaměřených na nalezení účinné léčby AD a 123 studií vhodných nefarmakologických intervencí garantovaných National Institute of Aging, další studie jsou sponzorovány jinými institucemi po celém světě (National Institute of Aging, 2021). Komplexní charakter etiopatogeneze AD a odhalování dalších potenciálních paralelních cest přispívajících ke vzniku a progresi AD patrně povede k většímu zaměření na simultánní ovlivnění několika procesů (Maramai et al., 2020).

Podpořeno grantem GAUK 966120, programem institucionální podpory vědy na UK Cooperatio, vědní oblast IMMU a projektem Studentského vysokoškolského výzkumu 260538/2020.

MUDr. Radovan Kunc
Hospic svatého Lazara
Sladkovského 2472/66a
326 00 Plzeň
e-mail: kuncradovan@gmail.com

LITERATURA

1. Abate G, Vezzoli M, Sandri M, Rungratanawanich W, Memo M, Uberti D. Mitochondria and cellular redox state on the route from ageing to Alzheimer's disease. Mech Ageing Dev, 192, 2020;192:s.111385.
2. Abner EL, Neltner JH, Jicha GA, Patel E, Anderson SL, Wilcock DM, Van Eldik LJ, Nelson PT. Diffuse Amyloid-β Plaques, Neurofibrillary Tangles, and the Impact of APOE in Elderly Persons' Brains Lacking Neuritic Amyloid Plaques. J Alzheimers Dis, 2018;64:1307–1324.
3. Aguzzi A, Rajendran L. The Transcellular Spread of Cytosolic Amyloids, Prions, and Prionoids. Neuron, 2009;64:783–790.
4. Aisen PS, Cummings J, Jack CR Jr, Morris JC, Sperling R, Frölich L, Jones RW, Dowsett SA, Matthews BR, Raskin J, Scheltens P, Dubois B. On the path to 2025: Understanding the Alzheimer's disease continuum. Alzheimer's Res Ther, 2017;9:1–10.
5. Aizenstein HJ, Nebes RD, Saxton JA, Price JC, Mathis CA, Tsopelas ND, Ziolko SK, James JA, Snitz BE, Houck PR, Bi W, Cohen AD,

Lopresti BJ, DeKosky ST, Halligan EM, Klunk WE. Frequent amyloid deposition without significant cognitive impairment among the elderly. Arch Neurol, 2008;65:1509–1517.
6. Bartus RT, Dean RL 3rd, Beer B, Lippa AS. The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. Science 1982;217:408–417.
7. Bateman RJ, Aisen PS, De Strooper B, Fox NC, Lemere CA, Ringman JM, Salloway S, Sperling RA, Windisch M, Xiong C. Autosomal-dominant Alzheimer's disease: a review and proposal for the prevention of Alzheimer's disease. Alzheimers Res Ther, 2011;3:1–13.
8. Bloom GS. Amyloid-β and tau: the trigger and bullet in Alzheimer disease pathogenesis. JAMA Neurol, 2014;71:505–508.
9. Bohnen NI, Grothe MJ, Ray NJ, Müller MLTM, Teipel SJ. Recent Advances in Cholinergic Imaging and Cognitive Decline – Revisiting the Cholinergic Hypothesis of Dementia. Curr Geriatr Reports. 2018;7:1–11.
10. Bosetti F, Brizzi F, Barogi S, Mancuso M, Siciliano G, Tendi EA, Murri L, Rapoport SI, Solaini G. Cytochrome c oxidase and mitochondrial F1F0-ATPase (ATP synthase) activities in platelets and brain from patients with Alzheimer's disease. Neurobiol Aging, 2002;23:371–376.
11. Braak E, Griffing K, Arai K, Bohl J, Bratzke H, Braak H. Neuropathology of Alzheimer's disease: what is new since A. Alzheimer? Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci, 1999;249 (Suppl 3):14–22.
12. Calkins MJ, Reddy PH. Assessment of newly synthesized mitochondrial DNA using BrdU labeling in primary neurons from Alzheimer's disease mice: Implications for impaired mitochondrial biogenesis and synaptic damage. Biochim Biophys Acta, 2011;1812:1182–1189.
13. Cummings J, Lee G, Ritter A, Sabbagh M, Zhong K. Alzheimer's disease drug development pipeline: 2019. Alzheimers Dement (N Y), 2019;5:272–293.
14. Davies P, Maloney AJ. Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease. Lancet 1976;2:1403.
15. de Leon MJ, Ferris SH, George AE, Christman DR, Fowler JS, Gentes C, Reisberg B, Gee B, Emmerich M, Yonekura Y, Brodie J, Kricheff II, Wolf AP. Positron emission tomographic studies of aging and Alzheimer disease. AJNR Am J Neuroradiol, 1983;4:568–571.
16. Du X, Wang X, Geng M. Alzheimer's disease hypothesis and related therapies. Transl Neurodegener, 2018;7:1–7.
17. Esparza TJ, Zhao H, Cirrito JR, Cairns NJ, Bateman RJ, Holtzman DM, Brody DL. Amyloid-β oligomerization in Alzheimer dementia versus high-pathology controls. Ann Neurol, 2013;73:104–119.
18. Esquerda-Canals G, Montoliu-Gaya L, Güell-Bosch J, Villegas S. Mouse Models of Alzheimer's Disease. J Alzheimers Dis, 2017;57:1171–1183.
19. Fang EF, Hou Y, Palikaras K, Adriaanse BA, Kerr JS, Yang B, Lautrup S, Hasan-Olive MM, Caponio D, Dan X, Rocktäschel P, Croteau DL, Akbari M, Greig NH, Fladby T, Nilsen H, Cader MZ, Mattson MP, Tavernarakis N, Bohr VA. Mitophagy inhibits amyloid-beta and tau pathology and reverses cognitive deficits in models of Alzheimer's disease. Nat Neurosci, 2019;22:401–412.
20. Francis PT, Palmer AM, Snape M, Wilcock GK. The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: A review of progress. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 1999;66:137–147.
21. Franková V. Optimalizace léčby Alzheimerovy choroby. Psychiatrie pro praxi, 2015;16,2015;79–82.
22. Frost B, Jacks RL, Diamond MI. Propagation of tau misfolding from the outside to the inside of a cell. J Biol Chem, 284,2009;12845–12852.
23. Guerreiro R, Bras J. The age factor in Alzheimer's disease. Genome Med, 2015;7:106.
24. Glenner GG and Wong CW. Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. Biochem Biophys Res Commun, 1984;120:885–890.
25. Goate A, Chartier-Harlin MC, Mullan M, Brown J, Crawford F, Fidani L, Giuffra L, Haynes A, Irving N, James L, Mant R, Newton P, Rooke K, Roques P, Talbot C, Pericak-Vance M, Roses A, Williamson R, Rossor M, Owen M, Hardy J. Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. Nature, 1991;349:704–706.
26. Goedert M. Oskar Fischer and the study of dementia. Brain, 2009;132:1102–1111.
27. Hane FT, Lee BY, Leonenko Z. Recent Progress in Alzheimer's Disease Research, Part 1: Pathology. J Alzheimers Dis, 2017;57:1–28.
28. Hardy JA, Higgins GA. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. Science, 1992;256:184–185.
29. Harper L, Barkhof F, Scheltens P, Schott JM, Fox NC. An algorithmic approach to structural imaging in dementia. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2014;85:692–698.
30. Huang YR, Liu RT. The Toxicity and Polymorphism of β-Amyloid Oligomers. Int J Mol Sci, 2020;21:4477.
31. Chow VW, Mattson MP, Wong PC, Gleichmann M. An overview of APP processing enzymes and products. Neuromolecular Med, 2010;12:1–12.
32. Iliff JJ, Wang M, Liao Y, Plogg BA, Peng W, Gundersen GA, Benveniste H, Vates GE, Deane R, Goldman SA, Nagelhus EA, Nedergaard M. A paravascular pathway facilitates CSF flow through the brain parenchyma and the clearance of interstitial solutes, including amyloid beta. Sci Transl Med, 2012;4:147ra11.
33. Iqbal K, Liu F, Gong C-X, Grundke-Iqbal I. Tau in Alzheimer disease and related tauopathies. Curr Alzheimer Res, 2010;7:656–664.
34. Jin M, Shepardson N, Yang T, Chen G, Walsh D, Selkoe DJ. Soluble amyloid beta-protein dimers isolated from Alzheimer cortex directly induce Tau hyperphosphorylation and neuritic degeneration. Proc Natl Acad Sci USA, 2011;108:5819–5824.
35. Jirák R, Laňková J. Demence – doporučený diagnostický a léčebný postup pro všeobecné praktické lékaře. Centrum doporučených postupů pro praktické lékaře, 2007. URL: <https://www.svl.cz/files/files/Doporucene-postupy/2017/DP-Demence.pdf> [cit. 28. 2. 2021]
36. Johnson AB, Blum NR. Nucleoside phosphatase activities associated with the tangles and plaques of Alzheimer's disease: a histochemical study of natural and experimental neurofibrillary tangles. J Neuropathol Exp Neurol, 1970;29:463–478.
37. Jonsson T, Atwal JK, Steinberg S, Snaedal J, Jonsson PV, Bjornsson S, Stefansson H, Sulem P, Gudbjartsson D, Maloney J, Hoyte K, Gustafson A, Liu Y, Lu Y, Bhangale T, Graham RR, Huttenlocher J, Bjornsdottir G, Andreassen OA, Jönsson EG, Palotie A, Behrens TW, Magnusson OT, Kong A, Thorsteinsdottir U, Watts RJ, Stefansson K. A mutation in APP protects against Alzheimer's disease and age-related cognitive decline. Nature, 2012;488:96–99.
38. Jucker M, Walker LC. Self-propagation of pathogenic protein aggregates in neurodegenerative diseases. Nature, 2013;501:45–51.
39. Kang J, Lemaire HG, Unterbeck A, Salbaum JM, Masters CL, Grzeschik KH, Multhaup G, Beyreuther K, Muller-Hill B. The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. Nature, 1987;325:733–736.
40. Karran E, De Strooper B. The amyloid cascade hypothesis: are we poised for success or failure? J Neurochem, 2016;139:237–252.
41. Katzman R. The Prevalence and Malignancy of Alzheimer Disease: A Major Killer. Arch Neurol 1976;33:217–218.
42. Lane CA, Hardy J, Schott JM. Alzheimer's disease. Eur J Neurol, 25,2018;59–70.
43. Liu PP, Xie Y, Meng XY, Kang JS. History and progress of hypotheses and clinical trials for Alzheimer's disease. Signal Transduct Target Ther, 2019;4:29.
44. Maramai S, Benchekroun M, Gabr MT, Yahiaoui S. Multitarget Therapeutic Strategies for Alzheimer's Disease: Review on Emerging Target Combinations. Biomed Res Int, 2020; 2020:5120230.
45. Masters CL, Simms G, Weinman NA, Multhaup G, McDonald BL, Beyreuther K. Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. Proc Natl Acad Sci USA, 1985;82:4245–4249.
46. Mastroeni D, Grover A, Delvaux E, Whiteside C, Coleman PD, Rogers J. Epigenetic mechanisms in Alzheimer's disease. Neurobiol Aging, 2011;32:1161–1180.
47. Mátl O, Mátlová M. Zpráva o stavu demence 2015. URL: <http://www.alzheimer.cz/res/data/002/000331.pdf> [cit. 28. 1. 2021]
48. McDonald JM, Savva GM, Brayne C, Welzel AT, Forster G, Shankar GM, Selkoe DJ, Ince PG, Walsh DM. Medical Research Council Cognitive Function and Ageing Study The presence of sodium dodecyl sulphate-stable Abeta dimers is strongly associated with Alzheimer-type dementia. Brain, 2010;133:1328–1341.
49. Morris GP, Clark IA, Vissel B. Inconsistencies and controversies surrounding the amyloid hypothesis of Alzheimer's disease. Acta Neuropathol Com, 2014;2:135.
50. Musiek ES, Holtzman DM. Three Dimensions of the Amyloid Hypothesis: Time, Space, and „Wingmen". Nat Neurosci, 2015;18:800–806.
51. National Institute of Aging. NIA-Funded Active Alzheimer's and Related Dementias Clinical Trials and Studies, 2021. URL: <https://www.nia.nih.gov/research/ongoing-AD-trials#section1> [cit. 22. 3. 2021]

52. Nikolaev A, McLaughlin T, O'Leary DDM, Tessier-Lavigne M. APP binds DR6 to trigger axon pruning and neuron death via distinct caspases. Nature, 2009;457:981–989.
53. Nizynski B, Dzwolak W, Nieznanski K. Amyloidogenesis of Tau protein. Protein Sci, 2017;26:2126–2150.
54. Pantiya P, Thonusin C, Chattipakorn N, Chattipakorn SC. Mitochondrial abnormalities in neurodegenerative models and possible interventions: Focus on Alzheimer's disease, Parkinson's disease, Huntington's disease. Mitochondrion, 2020;55:14–47.
55. Parker WD Jr, Filley CM, Parks JK. Cytochrome oxidase deficiency in Alzheimer's disease. Neurology, 1990;40:1302–1303.
56. Pidrman, V. Demence. Praha, Grada, 2007, 184 s.
57. Povova J, Ambroz P, Bar M, Pavukova V, Sery O, Tomaskova H, Janout Epidemiological of and risk factors for Alzheimer's disease: a review. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub, 2012;156:108–114.
58. Qizilbash N, Gregson J, Johnson ME, Pearce N, Douglas I, Wing K, Evans SJW, Pocock SJ. BMI and risk of dementia in two million people over two decades: a retrospective cohort study. Lancet Diabetes Endocrinol, 2015;3:431–436.
59. Resende R, Marques SC, Ferreiro E, Simoes I, Oliveira CR, Pereira CM Effect of alpha-synuclein on amyloid beta-induced toxicity:relevance to Lewy body variant of Alzheimer disease. Neurochem Res, 2013;38:797–806.
60. Ricciarelli R, Fedele E. The Amyloid Cascade Hypothesis in Alzheimer's Disease: It's Time to Change Our Mind. Curr Neuropharmacol, 2017;15:926–935.
61. Saito T, Matsuba Y, Mihira N, Takano J, Nilsson P, Itohara S, Iwata N, Saido TC. Single App knock-in mouse models of Alzheimer's disease. Nat Neurosci, 2014;17:661–663.
62. Santos RX, Correia SC, Zhu X, Smith MA, Moreira PI, Castellani RJ, Nunomura A, Perry G. Mitochondrial DNA oxidative damage and repair in aging and Alzheimer's disease. Antioxid Redox Signal, 2013;18:2444–2457.
63. Selkoe DJ, Hardy J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. EMBO Mol Med, 2016;8:595–608.
64. Serrano-Pozo A, Frosch MP, Masliah E, Hyman BT. Neuropathological alterations in Alzheimer disease. Cold Spring Harb Perspect Med, 2011;1:1–23.
65. Sery O, Povova J, Misek I, Pesak L, Janout V. Molecular mechanisms of neuropathological changes in Alzheimer's disease: a review. Folia Neuropathol, 2013;51:1–9.
66. Shankar GM, Li S, Mehta TH, Garcia-Munoz A, Shepardson NE, Smith I, Brett FM, Farrell MA, Rowan MJ, Lemere CA, Regan CM, Walsh DM, Sabatini BL, Selkoe DJ. Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. Nat Med 2008;14:837–842.
67. Sharma P, Srivastava P, Seth A, Tripathi PN, Banerjee AG, Shrivastava SK. Comprehensive review of mechanisms of pathogenesis involved in Alzheimer's disease and potential therapeutic strategies. Prog Neurobiol, 2019;174:53–89.
68. Small SA, Duff K. Linking Aβ and Tau in Late-Onset Alzheimer's Disease: A Dual Pathway Hypothesis. Neuron, 2008;60:534–542.
69. Strassnig M, Ganguli M. About a peculiar disease of the cerebral cortex: Alzheimer's original case revisited. Psychiatry (Edgmont), 2005;2:30–33.
70. Swearer JM, O'Donnell BF, Ingram SM, Drachman DA. Rate of progression in familial Alzheimer's disease. J Geriatr Psychiatry Neurol, 1996;9:22–25.
71. Swerdlow RH, Khan SM. A „mitochondrial cascade hypothesis" for sporadic Alzheimer's disease. Med Hypotheses, 2004;63:8–20.
72. Tatarnikova OG, Orlov MA, Bobkova N V. Beta-Amyloid and Tau--Protein: Structure, Interaction, and Prion-Like Properties. Biochem, 2015;80:1800–1819.
73. Thal DR, Rub U, Orantes M, Braak H. Phases of A beta-deposition in the human brain and its relevance for the development of AD. Neurology 2002;58:1791–1800.
74. Tsubuki S, Takaki Y, Saido TC. Dutch, Flemish, Italian, and Arctic mutations of APP and resistance of Abeta to physiologically relevant proteolytic degradation. Lancet, 2003;361:1957–1958.
75. Vandenabeele P, Fiers W. Is amyloidogenesis during Alzheimer's disease due to an IL-1-/IL-6-mediated ‚acute phase response' in the brain? Immunol Today, 1991;12:217–219.
76. Verghese PB, Castellano JM, Holtzman DM. Apolipoprotein E in Alzheimer's disease and other neurological disorders. Lancet Neurol, 2011;10:241–252.
77. Villemagne VL, Pike KE, Chételat G, Ellis KA, Mulligan RS, Bourgeat P, Ackermann U, Jones G, Szoeke C, Salvado O, Martins R, O'Keefe G, Mathis CA, Klunk WE, Ames, D, Masters CL, Rowe CC. Longitudinal assessment of Aβ and cognition in aging and Alzheimer disease. Annals Neurol, 2011;69:181–192.
78. Vyhnálek M, Bartoš A, Dostál V, Franková V, Holmerová I, Laczó J, Línek V, Rektorová I, Ressner P, Rusina R, Sheardová K, Vališ M, Hort, J. Diagnostikujeme a léčíme demence správně a včas? Výsledky průzkumu ve světle nových doporučení. Neurol praxi, 2011;12:352–358.
79. Wang JZ, Liu F. Microtubule-associated protein tau in development, degeneration and protection of neurons. Prog Neurobiol, 2008;85:148–175.
80. Wirths O, Zampar S. Neuron Loss in Alzheimer's Disease: Translation in Transgenic Mouse Models Int J Mol Sci, 21:s.81442020.
81. Xu L, Wang X, Tong C. Endoplasmic Reticulum-Mitochondria Contact Sites and Neurodegeneration. Front Cell Dev Biol, 2020;8:428.
82. Zhang Y, Thompson R, Zhang H, Xu H. APP processing in Alzheimer's disease. Mol Brain, 2011;24:3.
83. Zhu Y, Shan X, Yuzwa SA, Vocadlo DJ. The emerging link between O-GlcNAc and Alzheimer disease. J Biol Chem, 2014;289:34472–34481.
84. Zlokovic BV. Neurovascular mechanisms of Alzheimer's neurodegeneration. Trends Neurosci, 2005;28:202–208.