

OPONENTNÍ POSUDEK DIZERTAČNÍ PRÁCE :

Eva Machová : Cholinergní neurony a Alzheimerova choroba:

V předložené práci shrnula autorka na 54 stránkách, doplněných 5 reprinty vlastních prací, publikovaných v impaktovaných časopisech (v nichž je 4x první autorkou), výsledky své dizertační práce v přehledném, jasném a dobře strukturovaném textu.

Alzheimerova choroba je v současné době objektem intenzivního výzkumu jako degenerativní onemocnění mozku, jehož výskyt se zvyšuje s rostoucím věkem a postihuje každoročně vyšší počet osob. Jako jedno z mála onemocnění, kde jsou známy aspoň některé patologické markery, začíná být otevřenější výzkumu, zejména z hlediska molekulárního přístupu.

Z těchto markerů autorka nutně vychází a ve své práci se zabývá změnami ke kterým dochází v mozковém cholinergním systému v průběhu stárnutí u kontrolních myší a u transgenního myšího modelu Alzheimerovy choroby (APP^{swe}/PS1^{dE9}).

V této souvislosti se též zabývala vlivem dokosahexaenové kyseliny (omega 3 esenciální mastná kyselina) na udržování cholinergního fenotypu u neuronální cholinergní buněčné linie NG 108-15 a v pokusech ex vivo na mozkové kůře laboratorního potkana studiem účinku muskarinového agonisty xanomelinu, který byl vyvíjen jako lék pro selektivní posílení přenosu M1 muskarinovými receptory u Alzheimerovy choroby, na muskarinové M2 a M4 receptory.

Z pokusů vyplývá, že transgenní myši APP^{swe}/PS1^{dE9}, produkující zvýšené množství beta-amyloidu, vykazují úbytek některých markerů cholinergních synapsí a funkční poškození synaptické transmise již u mladých zvířat, u kterých se teprve začíná objevovat charakteristická patologie.

Poruchy se týkají presynaptické i postsynaptické části synapse.

Autorka na modelu cholinergní dediferenciace u neuronální cholinergní buněčné linie NG108-15, při odstranění séra z kultivovaného média, potvrdila obecný neuroprotektivní účinek dokosahexaenové kyseliny. V 10x vyšší, ale ještě fyziologické koncentraci podporuje tato kyselina i expresi cholinergního fenotypu zjišťovanou podle aktivity cholinesterázy.

Výsledky práce dizertantky tedy podporují cholinergní hypotézu Alzheimerovy nemoci, která předpokládá významnou úlohu oslabování cholinergní transmise již v časně fázi onemocnění. Dále práce ukazuje, že dostatečný příjem dokosahexaenové kyseliny v potravě může mít kromě obecného neuroprotektivního účinku příznivý vliv i na udržování fenotypu cholinergních neuronů. Výsledky funkčních pokusů s xanomelinem poskytují možné vysvětlení jeho vedlejších účinků, které vedly k přerušení klinického testování této látky. Navíc přispívají k pochopení mechanismu účinku xanomelinu, který by mohl sloužit jako prototyp nového druhu muskarinových agonistů s dlouhodobým působením.

V literárním úvodu podává dizertantka klinickou charakteristiku Alzheimerovy nemoci a podrobně uvádí současnou koncepci hypotéz vzniku tohoto onemocnění, soustředěnou na problematiku štěpení APP a podmínky vzniku beta-amyloidu za štěpení různými sekretázami, jež determinují jeho nerozpustnost a tím i jeho poškozující ukládání v mozkové tkáni.

Popisuje různé mechanismy vzniku sporadické a familiární formy Alzheimerovy nemoci včetně v roce 2007 uváděných mutací v APP, PS1 a PS2, které způsobují vznik AN postižením vlastního prekursoru beta-amyloidu nebo proteiny presenilin 1 nebo presenilin 2, které se jako součást enzymového komplexu gama-sekretázy podílejí na katabolismu prekursoru beta-amyloidu.

Dále autorka uvádí cholinergní hypotézu, vysvětlující vznik a rozvoj AN (Bartus a spol., 1982), jež předpokládá, že cholinergní neurony jsou vysoce citlivé k toxickému působení beta-amyloidu a že jejich poškození výrazně přispívá k vývoji Alzheimerovy choroby.

Cíle své práce formuluje dizertantka ve třech bodech :

- 1) Klade si otázku, zda je možné prokázat časně změny markerů cholinergních neuronů a muskarinové neurotransmise u myšího transgenního modelu Alzheimerovy choroby APP^{swe}/PS1^{dE9} a urychlení změn v průběhu stárnutí při srovnání s netransgenními kontrolami.
- 2) Dále jaký vliv má dokosahexaenová kyselina, která snižuje in vivo u myšího transgenního modelu Alzheimerovy choroby APP^{swe}/PS1^{dE9} produkci beta-amyloidu na expresi cholinergního fenotypu u cholinergní buněčné linie NG108-15 ?
- 3) A jaký vliv má xanomelin, považovaný původně za M1 selektivního muskarinového agonistu na autoregulaci uvolňování acetylcholinu M2 a M4 muskarinovými receptory z mozkových řezů potkana a jaký je mechanismus jeho účinku ?

Na základě výsledků svých prací dospěla autorka ke konkrétním zjištěním:

Transgenní myší model Alzheimerovy choroby APP^{swe}/PS1^{dE9} vykazuje při srovnání s netransgenními kontrolami ze stejného vrhu signifikantní úbytek markerů cholinergních synapsí a poškození muskarinové transmise již u mladých zvířat, u kterých se teprve začíná objevovat charakteristická patologie v době, kdy teprve dochází u urychlení tvorby beta-amyloidu. Tyto poruchy se týkají presynaptické (váčkový přenašeč pro acetylcholin) i postsynaptické (počet muskarinových receptorů) části synapse.

Důležitým nálezem je zejména porucha spřažení muskarinových receptorů s G-proteiny, která se u mladých zvířat projevuje snížením maximálního účinku a u starých zvířat zvýšením koncentrace agonisty potřebné k dosažení maximálního účinku.

Uvedená nálezy podporují koncepci cholinergní hypotézy Alzheimerovy choroby.

K otázce působení dokosahexaenové kyseliny testovala autorka model cholinergní dediferenciace u neuronální cholinergní buněčné linie NG108-15 po odstranění séra z kultivačního media a potvrdila obecný neuroprotektivní účinek této kyseliny.

Navíc při použití vyšší, i když ještě fyziologické dávky, podporuje tato kyselina dle výsledku studie autorky i expresi cholinergního fenotypu..

Poukazují tedy tyto výsledky k potvrzení příznivého vlivu přísunu této kyseliny jak na obecný neuroprotektivní účinek, tak i příznivý vliv na udržování fenotypu cholinergních neuronů.

Při studiu účinku předpokládaného M1 selektivního muskarinového agonisty xanomelinu zjistila autorka, že v přirozeném preparátu aktivuje xanomelin také M2 a M4 receptory a objasňuje fyziologický mechanismus jeho působení, který mohl být příčinou zastavení práce s touto látkou pro nepříznivé vedlejší účinky, ale po jejich řešení by mohl představovat model předlohy pro vývoj skutečně selektivních M1 agonistů.

Rozsah citované literatury je značný, obsahuje výchozí práce, o které se formulace autorčiných hypotéz opírá.

Zdá se mi, že v citované literatuře jsou méně kontinuálně zastoupeny práce bližší datace.

Závěr :

Domnívám se, že předložená disertace autorky se vyznačuje rozmyšleným a pečlivým, na aktuálních poznatcích vědy v oblasti znalosti molekulárních mechanismů Alzheimerovy nemoci, založeném designu výzkumu a vhodně zaměřených pokusech.

Dochází k závěrům, jež odpovídají předloženým hypotézám, jež si autorka položila a původním způsobem doplňují a obohacují znalosti u molekulárních mechanismů, týkajících se cholinergní hypotézy AN a exprese cholinergního fenotypu s ohledem na příznivý vliv přísunu dokosohexaenové kyseliny.

Podle mého názoru originálně a pracně řeší i otázku specifity a rozsahu působení xanomelinu.

Volba témat je původní, znalost problematiky důkladná, volba a provedení pokusů náročná na znalosti i laboratorní péči. Statistické zpracování je přiměřené.

Uzavírám, že dizertantská práce potvrzuje schopnosti autorky samostatné vědecké práce na výborné úrovni a doporučuji, aby její obhajoba byla přijata pro udělení titulu PhD. podle příslušného zákonného předpisu.

V Praze, dne 2.5.2008

Prof.MUDr.Petr Zvolský,DrSc.

