

**UNIVERZITA KARLOVA**  
**FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**

**Katedra biologických a lékařských věd**



**Mitochondriální dysfunkce a  
neurodegenerativní onemocnění**

**Diplomová práce**

**Vedoucí diplomové práce: doc. MUDr. Josef Herink, DrSc.**

**HRADEC KRÁLOVÉ 2018**

**Bc. Veronika Novotná**

### **Prohlášení**

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

**V Hradci Králové,**

**Podpis**

## **Poděkování**

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému vedoucímu diplomové práce panu doc. MUDr. Josefu Herinkovi, DrSc. za odborné vedení mé práce, poskytnutí odborné literatury a dále za ochotu, připomínky, čas a cenné rady, které mi věnoval v průběhu psaní diplomové práce.

Velké poděkování také patří mé rodině a přátelům za pomoc a podporu během studia.

# Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biologických a lékařských věd

Autor: Bc. Veronika Novotná

Školitel: doc. MUDr. Josef Herink, DrSc.

Název: Mitochondriální dysfunkce a neurodegenerativní onemocnění

Diplomová práce se zabývá mitochondriálními dysfunkcemi a neurodegenerativními nemocemi a je rozdělena na dvě hlavní části. První část se zabývá klasifikací neurodegenerativních onemocnění a obecnou charakteristikou mitochondrií. Dále jsou popsány procesy oxidačního stresu, excitotoxicity, apoptózy a stručně popsán nervový systém. Druhá část se zabývá popisem mitochondriálních dysfunkcí u vybraných neurodegenerativních onemocnění. Současné studie poukazují na souvislost mezi mitochondriálními dysfunkcemi a vznikem neurodegenerativních onemocnění.

**Klíčová slova:** excitotoxicita, mitochondriální dysfunkce, neurodegenerativní onemocnění, zánik neuronu, oxidativní poškození

## **Abstract**

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biological and Medical Sciences

Author: Bc. Veronika Novotná

Supervisor: doc. MUDr. Josef Herink, DrSc.

Title of diploma thesis: Mitochondrial dysfunction and neurodegenerative diseases

The diploma thesis deals with mitochondrial dysfunction and neurodegenerative diseases and it is divided into two main parts. The first part summarized the classification of neurodegenerative diseases and general characteristic of mitochondria. Then a describe of the processes of oxidative stress, excitotoxicity, apoptosis and briefly describe the nervous system. The second part deals with description of mitochondrial dysfunction in selected neurodegenerative diseases. The recent studies refer to connection between mitochondrial dysfunctions and formation of neurodegenerative diseases.

**Keywords:** excitotoxicity, mitochondrial dysfunction, neurodegenerative disorders, neuronal cell death, oxidative damage

# Obsah

Úvod .....	9
Zadání práce .....	10
Cíl práce .....	12
1. Klasifikace neurodegenerativních onemocnění .....	13
1.1 Charakteristika neurodegenerativních onemocnění .....	13
1.2 Rozdělení neurodegenerativních onemocnění .....	13
1.2.1 Alzheimerova nemoc a stárnutí .....	15
1.2.2 Tauopatie .....	16
1.2.2.1 Frontotemporální demence .....	16
1.2.2.2 Progresivní supranukleární obrna (Steeleův-Richardsonův-Olszewskiho syndrom).....	17
1.2.2.3 Kortikobazální degenerace .....	17
1.2.2.4 Nemoc s argyrofilními zrny .....	17
1.2.3 Fronto-temporální lobární degenerace (FTLD).....	18
1.2.4 Synukleinopatie .....	18
1.2.4.1 Parkinsonova nemoc .....	18
1.2.4.2 Demence s Lewyho tělísky .....	20
1.2.4.3 Mnohotná systémová atrofie .....	20
1.2.5 Onemocnění s opakováním tripletů.....	20
1.2.5.1 Huntingtonova nemoc .....	21
1.2.5.2 Friedreichova ataxie .....	22
1.2.6 Prionová onemocnění .....	22
1.2.7 Onemocnění motorického neuronu .....	23
2. Mitochondrie .....	24
2.1 Struktura a funkce mitochondrií.....	24
2.1.1 Mitochondriální DNA .....	25

2.2 Mitochondrie a oxidační stres .....	25
2.2.1 Volné radikály a oxidační stres .....	25
2.2.2 Důsledky zvýšeného oxidačního stresu.....	27
2.2.2.1 Změny tvaru a funkce mitochondrií .....	27
2.2.2.2 Postranlační modifikace mitochondriálních proteinů.....	28
2.2.2.3 Mechanismy buněčné smrti při zvýšeném oxidačním stresu.....	30
2.3 Mitochondrie a excitotoxicita.....	30
2.3.1 Úloha vápenatých iontů v mitochondriích .....	31
2.4 Mitochondrie a apoptóza.....	31
2.5 Mitochondrie a nervový systém .....	32
2.5.1 Neurony.....	32
2.5.2 Neuroglie.....	32
2.5.3 Úloha mitochondrií v nervovém systému .....	32
2.5.4 Úloha neuroplasticity v nervovém systému .....	33
2.5.4.1 Neuroplasticita neuronů .....	33
2.5.4.2 Poškození neuroplasticity.....	33
3. Mitochondriální dysfunkce u vybraných neurodegenerativních onemocnění .....	35
3.1 Alzheimerova nemoc (AD) .....	36
3.1.1 Alzheimerova nemoc a oxidační stres.....	37
3.1.2 Alzheimerova nemoc a inzulínová signalizace .....	40
3.2 Parkinsonova nemoc (PD).....	43
3.2.1 Parkinsonova nemoc a oxidační stres.....	43
3.2.2 Parkinsonova nemoc a mikroglie .....	45
3.2.3 Parkinsonova nemoc a mitochondriální DNA .....	45
3.2.4 Geny asociované s monogenní Parkinsonovou nemocí .....	46
3.2.4.1 PARK 1/4 –SNCA .....	46
3.2.4.2 PARK2- parkin.....	47

3.2.4.3 PARK 3 .....	48
3.2.4.4 PARK 5 – UCH-L1 .....	48
3.2.4.5 PARK 6 – PINK 1 .....	48
3.2.4.6 PARK 7 – DJ-1 .....	49
3.2.4.7 PARK 8- LRRK 2 .....	49
3.3 Huntingtonova nemoc (HD).....	50
3.3.1 Huntingtonova nemoc a vápenaté ionty .....	50
3.3.2 Huntingtonova nemoc a oxidační stres .....	50
3.3.3 Huntingtonova nemoc a dynamika mitochondrií .....	51
3.4 Friedreichova ataxie .....	52
3.5 Amyotrofická laterální skleróza .....	53
3.6 Leberova hereditární optická neuropatie .....	53
3.7 Autozomálně dominantně dědičná optická atrofie.....	54
3.8 Charcot- Marie- Tooth dědičná neuropatie typu 2 .....	54
3.9 Myoklonická epilepsie s „ragged-red“ vlákny .....	55
3.10 Ataxie .....	55
4. Mitochondriální dysfunkce u nedegenerativních poškození mozku .....	57
4.1 Cévní mozková příhoda .....	57
4.2 Traumatické poranění mozku.....	58
5. Závěr.....	60
6. Použité zkratky .....	61
7. Seznam tabulek .....	64
8. Seznam použité literatury .....	65



# Úvod

Diplomová práce se zabývá popisem vztahu mezi mitochondriálními dysfunkcemi a neurodegenerativními onemocněními.

Neurodegenerativní onemocnění jsou progresivní onemocnění nervového systému, kde se na vzniku onemocnění podílí více faktorů. Mezi tyto faktory řadíme apoptózu, volné radikály, které vznikají oxidačním stresem, dále patologické proteinové agregáty a vlivy genetického pozadí (Matěj a Rusina, 2012; Rohan a kol., 2015).

Mitochondriální dysfunkce jsou způsobeny poškozením dýchacího řetězce nebo snížením činnosti mitochondrií. Mitochondrie v buňkách vyrábějí pomocí enzymů citrátového cyklu a oxidační fosforylace ATP (adenosintrifosfát), který slouží jako zdroj energie pro buňky (Dylevský, 2000; Fišar a kol., 2011; Trojan a kol., 1996).

V současné době je známo více než 300 mutací mitochondriální DNA, které souvisejí s různými nemocemi. Podle současných poznatků se mitochondriální dysfunkce podílejí na vzniku neurodegenerativních onemocnění (Federico a kol., 2012).

Mitochondriální dysfunkce mají za následek i nedegenerativní poškození mozku, mezi které řadíme cévní mozkové příhody a traumatická poranění mozku.

## **Zadání práce**

Název práce v českém jazyce: Mitochondriální dysfunkce a neurodegenerativní onemocnění

Název práce v anglickém jazyce: Mitochondrial dysfunction and neurodegenerative diseases

Klíčová slova: excitotoxicita, mitochondriální dysfunkce, neurodegenerativní onemocnění, zánik neuronu, oxidativní poškození

Klíčová slova anglicky: excitotoxicity, mitochondrial dysfunction, neurodegenerative disorders, neuronal cell death, oxidative damage

Akademický rok vypsání: 2016/2017

Typ práce: diplomová práce

Jazyk práce: čeština

Ústav: Katedra biologických a lékařských věd (16-16150)

Vedoucí / školitel: doc. MUDr. Josef Herink, DrSc.

Řešitel: Bc. Veronika Novotná

Datum zadání: 11.12.2016

Náplň práce:

Abstrakt: česk./angl.

Úvod (obecná charakteristika neurodegenerativních onemocnění - přítomnost oxidačního stresu, proteinových depozit, excitotoxicity a následné apoptózy)

Klasifikace neurodegenerativních onemocnění

Struktura a funkce mitochondrií

Mitochondrie a oxidační stres

Mitochondrie a excitotoxicita (úloha  $Ca^{++}$ )

Mitochondrie a apoptóza

Mitochondriální dysfunkce u vybraných neurodegenerativních onemocnění

Závěry

Seznam použité literatury

### **Seznam odborné literatury:**

Abolhassani N. et al.: Molecular pathophysiology of impaired glucose metabolism, mitochondrial dysfunction, and oxidative DNA damage in Alzheimers disease brain. *Mechanisms Aging&Development*, 37, 2015, 1-10.

Akbar M. et al.: Mitochondrial dysfunction and cell death in neurodegenerative diseases

through nitrooxidative stress. *Brain Res.*, 1637,2016, 34-55.

Bhat A. H. et al.: Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and neurodegenerative diseases: A mechanistic insight. *Biomedicine&Pharmacotherapy* 74, 2015, 101-110

Fišar Z. et al.: Úloha mitochondrií v mechanismech synaptické plasticity, buněčného poškození a poruch nálady. *Čes. a slov. Psychiat.*, 107, 2011, 14-27.

Marková M., Hansíková H.: Úloha mitochondrií v patogenezi Huntingtonovy choroby. *Klin.Biochem.Metab.*, 24, 2016, 27-31.

Matěj R., Rusina R.: Neurodegenerativní onemocnění. *Lékařské listy*, 10, 2013, 1-4.

Matěj R., Rusina R.: Neurodegenerativní onemocnění: přehled současné klasifikace a diagnostických neuropatologických kritérií. *Česk. Patol.*, 48, 2012, 83-90.

Opletal et al.: Antioxidanty a degenerativní onemocnění. *Prakt. Lékáren.*, 9, 2013, 135-138.

Subramaniam S. R., Chesselet M. F.: Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in Parkinsons disease. *Progr. Neurobiol.*, 106-107, 2013, 17-32.

Wang X. et al.: Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in Alzheimers disease. *Biochimica&Biophysica Acta*, 1842, 2014, 1240-1247

## **Cíl práce**

Hlavním cílem mé práce je vypracovat přehlednou rešerši, která má za cíl popsat složitou problematiku mitochondriálních dysfunkcí a neurodegenerativních onemocnění.

Cílem první části práce je klasifikace a charakterizace neurodegenerativních onemocnění, popis mitochondrií a objasnění procesů excitotoxicity a apoptózy. Dále je zde stručně popsán nervový systém a jeho vztah k mitochondriím.

Cílem druhé části práce je popis mitochondriálních dysfunkcí u konkrétních neurodegenerativních onemocnění a objasnění mechanismu vzniku těchto onemocnění.

Mitochondriální dysfunkce vznikají i u nedegenerativních poškození mozku, do této skupiny poškození řadíme cévní mozkovou příhodu a traumatické poranění mozku.

V práci je dále zmíněna problematika antioxidantů, což jsou nepostradatelné látky, které snižují následky poškození oxidačním stresem.

# **1. Klasifikace neurodegenerativních onemocnění**

## **1.1 Charakteristika neurodegenerativních onemocnění**

Neurodegenerativní onemocnění jsou progresivní onemocnění nervového systému. Charakteristickým rysem těchto chorob je úbytek specifických skupin neuronů. Neuropatologická diagnóza se opírá o histologické změny v určitých oblastech mozku a míchy a o průkaz specifických neuronálních a/nebo gliových proteinových inkluzí, které jsou specifické pro určitá onemocnění (Matěj a Rusina, 2012).

U neurodegenerativních onemocnění se obvykle setkáváme s kombinací různých patogenetických vlivů, z nichž jsou nejvýznamnější apoptóza, volné radikály, patologické proteinové agregáty a vliv genetického pozadí. Lze tedy říci, že podstatou neurodegenerativních onemocnění je společná kombinace ukládání specifického proteinu v mozkové tkáni s obecnými mechanismy apoptózy a autofagie. V současné době jsou neurodegenerativní onemocnění popisována jako specifické proteinopatie (Matěj a Rusina, 2012; Rohan a kol., 2015).

Klinickým obrazem konkrétního onemocnění je postižení určité skupiny neuronů a u řady onemocnění progrese poškození daného proteinu (např. Alzheimerova nemoc, demence s Lewyho tělísky). Určení správné diagnózy je velmi obtížné. Diagnózu lze potvrdit pouze na základě neuropatologie pomocí imunohistochemického průkazu markeru, tj. typického nativního nebo patologicky modifikovaného proteinu ve specifické oblasti mozku (Rohan a kol., 2015).

## **1.2 Rozdělení neurodegenerativních onemocnění**

Podle současné klasifikace se v názvu daného onemocnění uplatňuje nejvýznamnější patofyziologický děj, a z tohoto důvodu se v názvu onemocnění objevuje hlavní změněný protein (Matěj a Rusina, 2012). V tabulce 1 jsou neurodegenerativní choroby rozděleny do 8 základních skupin.

**Tabulka 1: Rozdělení neurodegenerativních onemocnění**

<b>1. Alzheimerova nemoc a stárnutí</b>
<b>2. Tauopatie</b> a. frontotemporální demence (FTD) b. progresivní supranukleární obrna (Steele-Richardson-Olszewského syndrom) c. kortikobazální degenerace d. nemoc s argyrofilními zrny
<b>3. Fronto-temporální lobární degenerace (FTLD)</b> a. FTLD s ubiquitin pozitivními inkluzemi (FTLD-UPS) b. FTLD asociovaná s onemocněním motorického neuronu (FTLD-MND) c. FTLD s inkluzemi proteinu TDP-43 (FTLD-TDP), zahrnuje i sémantickou demenci d. FTLD bez histologických změn (DLDH)
<b>4. Synukleinopatie</b> a. Parkinsonova nemoc b. demence s Lewyho tělísky c. mnohotná systémová atrofie (MSA)
<b>5. Onemocnění s opakováním tripletů</b> a. Huntingtonova nemoc b. řada autozomálně dominantních spinocerebellárních ataxií c. Friedreichova ataxie d. bulbospinální atrofie (Kennedyho nemoc) e. dentato-rubro-pallido-luysiánská atrofie
<b>6. Prionová onemocnění</b> a. Creutzfeldtova-Jakobova nemoc (CJN) b. Gerstmannův-Sträusslerův-Scheinkerův syndrom c. fatální familiární insomnie d. kuru
<b>7. Onemocnění motorického neuronu</b> a. amyotrofická a primární laterální skleróza b. spinální muskulární atrofie
<b>8. Ostatní neurodegenerativní onemocnění</b>

*Zdroj: Matěj a Rusina, Neurodegenerativní onemocnění: přehled současné klasifikace a diagnostických neuropatologických kritérií, 2012 (převzato)*

### 1.2.1 Alzheimerova nemoc a stárnutí

Při Alzheimerově nemoci (AD, z angl. *Alzheimer's disease*) probíhají v zásadě podobné změny jako při stárnutí. Dochází k poklesu hmotnosti a objemu mozku, snížení tloušťky mozkové kůry a k rozšíření mozkových komor. Změny jsou výraznější u presenilních onemocnění, kde oproti zkoumaným kontrolním mozkům může dojít k poklesu hmotnosti až o 200 až 300 g. Numerická atrofie neuronů při AD ovšem převyšuje numerickou atrofii, která je spojena s prostým stárnutím. K poklesu neuronů dochází v oblastech mozkové kůry i v podkorových oblastech a důsledkem tohoto poklesu je narušení funkce projekčních oblastí. Míra poškození kognitivních funkcí souvisí s numerickou atrofií neuronů i množstvím  $\beta$ -amyloidu zejména v hipokampu. Při AD dochází jednak k úbytku cholinergních neuronů bazálního telencefala, jednak i k poklesu korové acetylcholinesterázy a cholinacetyltransferázy. Během progresu AD se mění i dendritické systémy se synapsemi. Synapse rovněž numericky atrofují, ale jejich postižení není v mozkové kůře rovnoměrné, kůra čelního a spánkového laloku je postižena více než kůra týlní. Poškození korových synapsí je úměrné poškození kognitivních funkcí. Poškození v hipokampu je přímo úměrné poškození paměti (Koukolík a Jiráček, 1998).

Celosvětově trpí AD asi 47,7 milionu lidí a každý rok se objeví 7,7 milionu nových případů (Abolhassani a kol., 2015).

Existují dva hlavní patologické znaky. Prvním jsou senilní (amyloidové) plaky vznikající z  $\beta$ -amyloidu a druhým pak neuronální klubka (tangles) tvořená hyperfosforylovaným tau proteinem. Neuronální klubka se nejdříve objevují v amygdale a parahipokampálním závitě, později v hipokampu a temporálním kortexu. Vyskytují se laminárně a postiženy jsou jen některé vrstvy mozkové kůry (Abolhassani a kol., 2015; Matěj a Rusina, 2012).

AD se dělí na dvě formy, sporadickou a dědičnou. Dědičná forma je způsobena mutací v genech, které se zapojují do produkce  $\beta$ -amyloidu, jedná se o amyloidový prekurzorový protein (APP), presenilin 1 a presenilin 2. Ojedinelé (sporadické) AD, známé také jako AD s pozdním nástupem, jsou nejčastějším podtypem demence (60-80%). Asi 1% případů AD vzniká v důsledku mutací na některém ze tří specifických genů pro APP, proteiny presenilin1 a presenilin 2, které regulují poslední úpravy APP prostřednictvím  $\gamma$  sekretázy, která štěpí APP. U jedinců s mutacemi v kterékoli z těchto tří dominantně zděděných genů, se mohou vyvinout symptomy AD už před 65. rokem a někdy již ve věku 30 let. Bylo prokázáno, že amyloidní plaky mohou být přítomny u pacientů zatížených těmito mutacemi o více než 20 let před vlastní klinickou manifestací demence. Drtivá většina jedinců se sporadickou AD trpí

onemocněním s pozdním nástupem, které začíná nastupovat ve věku 65 let nebo později. Podobně jako u jiných chronických onemocnění se sporadická AD rozvíjí v důsledku působení více faktorů a ne jen jako výsledek působení pouze jedné příčiny (Abolhassani a kol., 2015; Wang a kol., 2014).

## 1.2.2 Tauopatie

Tauopatie jsou neurodegenerativní onemocnění, při kterých dochází k hromadění modifikovaných forem proteinu tau v kůře frontálních, parietálních a temporálních laloků, v bazálních gangliích a v mezencefalu. Název proteinu tau je odvozen z anglického názvu „*tubulin associates unit*“. Z názvu plyne, že se jedná o bílkovinu, která se po fosforylaci váže na tubulin mikrotubulů, startuje jejich polymerizaci a aktivně se podílí na intracelulárním transportu. Po defosforylaci se účastní stabilizace mikrotubulů. Při tauopatiích dochází k poškození intracelulárního metabolismu tohoto proteinu tau (Matěj a Rusina, 2012; Rusina a kol., 2015).

Ve zdravém mozku se protein tau vyskytuje v šesti izoformách. Tento protein se skládá z 352- 441 aminokyselin a jeho molekulová hmotnost se pohybuje okolo 50- 65 kDa. Protein tau je kódován genem MAPT (z angl. *Microtubulin Associated Protein Tau*) na 17. chromozomu. Za patologických stavů dochází k hyperfosforylaci proteinu tau na specifických vazebných místech, což vede k ukládání špatně odbouratelných proteinových agregátů v podobě objemných inkluzí. Výsledkem je apoptóza takto postižených buněk. Podle počtu opakování vazebného místa pro molekuly mikrotubulů (*direct-repeats*, DR) se tauopatie dělí do 3 základních skupin. Nejvíce převažují tři (DR3) a čtyři (DR4) a zároveň se zohledňuje i haplotypizace genu MAPT (H1 a H2) (Matěj a Rusina, 2012; Rusina a kol., 2015).

Tauopatie se řadí do skupiny onemocnění fronto-temporální lobární degenerace (FTLD) a jsou označovány jako FTLD- tau. Do tauopatií řadíme frontotemporální demence, progresivní supranukleární obrnu (Steele-Richardson-Olszewského syndrom), kortikobazální degenerace a nemoc s argyrofilními zrny (Matěj a Rusina, 2012; Rusina a kol., 2015).

### 1.2.2.1 Frontotemporální demence

Ve frontotemporálních demencích jsou zahrnuty tři klinicko-patologické stavy: „vlastní“ frontotemporální demence (FTD – někdy se uvádí termín behaviorální varianta – bvFTD), progresivní neplynulá (nonfluentní) afázie (PNFA) a sémantická demence (SD). FTD se vyznačuje postižením funkcí frontálního laloku s časnými změnami osobnosti a těžkými poruchami chování. Progresivní neplynulá afázie a sémantická demence se projevují



poruchami řeči. Atrofie frontálních a temporálních laloků bývá asymetrická. U FTD bývá postižena více pravá strana, u progresivních afázií levá strana. Atrofické gyry mohou makroskopicky připomínat „ostří nože“ nebo listy. Postiženy mohou být i oboustranně hipokampy a amygdala a méně i bazální ganglia. Dochází k těžké atrofii neuronů, astrocytóze a spongióze, začínající nejdříve v II. a III. korové vrstvě (Matěj a Rusina, 2012; Rusina a kol., 2015).

### **1.2.2.2 Progresivní supranukleární obrna (Steeleův- Richardsonův-Olszewskiho syndrom)**

Toto onemocnění je vzácné a začíná po 40. roce života. Nejčastějšími příznaky jsou časná posturální instabilita a pády a vertikální supranukleární obrna pohledu. Dále dochází k akineticko-rigidnímu syndromu se symetrickou bradykinézou a axiální rigiditou, neodpovídající na léčbu levodopou (Koukolík a Jiráček, 1998).

Při této nemoci se vyskytují globoidní neuronální klubka s hyperfosforylovaným tau proteinem s predominancí DR4 isoformy a vyskytující se především v subkortikálních oblastech. Hodnota numerické atrofie a miózy kolísá. Imunohistochemicky se prokazují změněné astrocyty a oligodendroglie i patologická vlákna v bazálních gangliích, mezimozku a mozковém kmeni. Poškozena bývá *substantia nigra*, *locus coeruleus*, *globus pallidus*, *nucleus subthalamicus*, periaqueductální šedí mezencefala, jádra hlavových nervů v pontu a mezencefalu a *nucleus dentatus* mozečku (Matěj a Rusina, 2012; Rusina a kol., 2015).

### **1.2.2.3 Kortikobazální degenerace**

U této degenerace se vyskytuje predominance DR4 isoformy. V *substantia nigra* a pallidu se vyskytují numerické atrofie neuronů a mióza s basofilními inkluzemi. Ve zbývajících pigmentových neuronech *substantia nigra* se nacházejí tzv. bledé inkluze. Pickova tělíska, Lewyho tělíska, neuritické plaky a neuronální klubka se zde nenacházejí. Toto onemocnění se projevuje kombinací extrapyramidových symptomů a korové dysfunkce v parietální oblasti (Matěj a Rusina, 2012; Rusina a kol., 2015).

### **1.2.2.4 Nemoc s argyrofilními zrny**

Při tomto onemocnění také převažuje DR4 isoforma patologického tau proteinu, který se vyskytuje v podobě argyrofilních zrn, často se vyskytuje společně s AD nebo jinými tauopatiemi (Rusina, 2012; Rusina a kol., 2015).

### 1.2.3 Fronto-temporální lobární degenerace (FTLD)

FTLD se vyznačuje selektivní atrofií frontálního a temporálního kortexu, kde dochází k úbytku neuronů, glióze a spongióze povrchových vrstev. FTLD zahrnují značně heterogenní skupinu onemocnění a jednotlivé typy jsou rozlišovány a řazeny do skupin podle typu akumulovaného patologického proteinu (Menšíková a kol., 2016).

Na základě imunohistochemického vyšetření a vlastností intracelulárních inkluzí jsou FTLD děleny na tauopatie a non-tau FTLD s neuronálními a/nebo gliálními inkluzemi pozitivními v imunohistochemickém průkazu s protilátkou proti ubikvitinu (ubikvitinopatie-FTLD-UPS), FTLD s inkluzemi proteinu TDP-43 (FTLD-TDP) různých tvarů a typů (Matěj a Rusina, 2012).

### 1.2.4 Synukleinopatie

Mezi synukleinopatie jsou zahrnuty Parkinsonova nemoc, demence s Lewyho tělísky a multisystémová atrofie. Hlavním příznakem je parkinsonský syndrom, který se vyznačuje hypokinézou, rigiditou, třesem a posturální instabilitou. Dalšími příznaky mohou být kognitivní postižení, mozečkové nebo autonomní dysfunkce. Typickým nálezem jsou intracelulární inkluze patologicky konformovaného proteinu alfa-synukleinu. Základními typy těchto inkluzí jsou Lewyho tělíska, Lewyho neurity a oligodendroglální inkluze (tzv. Pappovy-Lantosovy inkluze). Lewyho tělíska mohou být přítomny v klasické kmenové formě (eozinofilní, s periferním projasněním) nebo v méně výrazné korové formě (eozinofilní, bez haló). Lewyho neurity jsou výběžky neuronů, obsahující agregovaný alfa-synuklein. Pro jejich průkaz musí být použito specifických protilátek proti alfa-synukleinu nebo ubikvitinu. Pappovy-Lantosovy inkluze jsou „plaménkové“ inkluze v oligodendroglii viditelné pomocí imunohistochemického průkazu interakce s protilátkou proti alfa-synukleinu pomocí impregnace solemi stříbra (Rohan a kol., 2015).

V posledních deseti letech došlo ke změnám v klasifikaci synukleinopatií. Nejdříve byla definována demence s Lewyho tělísky (DLB) a později byla re-definována Parkinsonova nemoc s demencí (PDD). Bylo stanoveno diferenciatně diagnostické kritérium rychlosti rozvoje kognitivní poruchy pro rozlišení těchto dvou nemocí (Menšíková a kol., 2013).

#### 1.2.4.1 Parkinsonova nemoc

Parkinsonova nemoc (PD, z angl. *Parkinson's disease*) je nejčastější pohybové onemocnění a druhé nejčastěji se vyskytující neurodegenerativní onemocnění na světě a vyskytuje se u 2

% populace starší 65 let. PD se projevuje ztrátou dopaminergních neuronů v *substantia nigra pars compacta*, která vede ke snížení dopaminu v bazálních gangliích, druhým projevem je tvorba Lewyho tělísek, což jsou eozinofilní nitrobuněčné inkluze, které jsou tvořeny fibrilárním alfa-synukleinem. Převládá názor, že ztráta dopaminu dokáže způsobit deregulaci ve funkci bazálních ganglií a toto narušení se poté projevuje motorickými poruchami jako je bradykineze (celkové zpomalení pohybů), klidový třes, rigidita a posturální nestabilita. Dále se mohou objevit i poruchy spánku, deprese, snížení kognitivních funkcí a také autonomní a senzorické dysfunkce. Molekulární patogeneze PD je velice složitá a skládá se z různých a mezi sebou interagujících jevů. Mezi nejvýznamnější patří agregáty alfa-synukleinu, narušené odbourávání proteinů v ubikvitin-proteazomovém systému, mitochondriální dysfunkce a oxidační stres, zánětlivá reakce spojená s gliální aktivací, odchylky v aktivaci buněčného cyklu a deregulace apoptózy. Tyto patologické změny vznikají na bázi působení primárních příčin, jako jsou negativní vlivy životního prostředí, biologické stárnutí a genetické změny (mutace a polymorfismy) (Subramaniam a Chesselet, 2013).

PN začíná nejčastěji mezi 60. -70. rokem života. Anglosaská literatura používá označení *late-onset* (PN s pozdním začátkem). PN se totiž může projevit už před 40. rokem věku a tato forma bývá označována *early-onset* (PN s časným začátkem). Tato časná forma se liší oproti pozdní formě v klinických projevech. U těchto pacientů je pomalejší progres, lepší odpověď na dopaminergní terapii a kognitivní funkce zůstávají dlouhou dobu nezměněné (Subramaniam a Chesselet, 2013).

PN byla dlouho považována za sporadické onemocnění, ale díky vývoji genetiky byly objeveny mutace zodpovědné za monogenní PN a dnes je známo 12 lokusů a 8 genů, v nichž se tyto mutace nacházejí. Tato forma PN je přenášena vždy jen jedním genem. Jen pouhá přítomnost mutace neznamená, že se onemocnění projeví a jsou potřeba i další faktory jako jsou například změny provázející stárnutí. Mutace genů vyskytující se u familiární PD jsou alfa-synuklein (PARK1/4), parkin (PARK2), PINK1 (PARK6), DJ-1 (PARK7), LRRK2 (PARK8) a ATP13A2 (PARK9) a vzácně se vyskytují u PARK3, UCHL1 (PARK5), GIGYF2 (PARK11), HTRA2 (PARK13) a PLA2G6 (PARK14) (Subramaniam a Chesselet, 2013).

Nehledě na různý původ onemocnění mají sporadická a monogenní forma PD podobné biochemické, patologické a klinické aspekty. U obou forem byla pozorována mitochondriální dysfunkce (Subramaniam a Chesselet, 2013).

#### 1.2.4.2 Demence s Lewyho tělísky

Demence s Lewyho tělísky (z angl. *Dementia with Lewy bodies*, DLB) je neurodegenerativní onemocnění na pomezí PD a AD. Toto onemocnění nese příznaky obou poruch a navíc i své specifické příznaky, jako jsou zrakové halucinace lidských postav a zvířat. Odlišení této nemoci je z důvodu prolínání s PD a AD obtížné (Konrád, 2004).

Charakteristickou vlastností tohoto onemocnění je kombinace postižení struktur mozkového kmene, nejvíce *substantia nigra* (jako u PD) a výskyt Lewyho tělísek v paralimbických a nekortikálních strukturách mozkové kůry (Konrád, 2004).

Lewyho tělísky jsou inkluze obsažené v neuronech a jsou tvořeny abnormálně fosforylovanými proteinovými neurofilamenty nahromaděného alfa-synukleinu a ubikvitinu (McKeith, 2002).

U DLB byly zjištěny i imunoreaktivní neuritické degenerativní procesy. Tyto procesy se zřejmě podílejí na vzniku neuropsychiatrických symptomů větší měrou než přítomná Lewyho tělísky. Ve většině případů bývají přítomny i Alzheimerovské neuritické plaky a tauopatie. Při DLB dochází k depleci acetylcholinové neurotransmise v nekortikálních strukturách, která je dokonce významnější než u AD. Tento jev je následkem degenerace cholinergních projekčních presynaptických neuronů v mozkovém kmeni a především v bazálním telencefalu (Konrád, 2004).

#### 1.2.4.3 Mnohotná systémová atrofie

V klinickém obraze se u mnohotné systémové atrofie (MSA) objevují v různé kombinaci projevy mozečkové, parkinsonské, pyramidové a dysautonomie. Při MSA dochází k apoptóze oligodendroglíí a mikroskopicky jsou patrné numerická atrofie neuronů, reaktivní astroglóza a demyelinizace. Nejvíce jsou zasaženy kaudální putamen, laterální oblasti *substantia nigra*, *locus coeruleus*, Purkyňovy buňky ve *vermis cerebelli*, Onufovo jádro v sakrální míše, *nucleus dorsalis n. X* a další. Postižení katecholaminergních neuronů v prodloužené míše zodpovídá za poruchy autonomních funkcí. Charakteristickým diagnostickým znakem jsou argyrofilní cytoplazmatické inkluze v oligodendroglíích, které jsou nazývány plaménkové nebo také Pappovy-Lantosovy buňky (Matěj a Rusina, 2012).

#### 1.2.5 Onemocnění s opakováním tripletů

V této skupině jsou nejvýznamnějšími onemocněními Huntingtonova nemoc a Friedreichova ataxie (Matěj a Rusina, 2012).

### 1.2.5.1 Huntingtonova nemoc

Huntingtonova nemoc (HD, z angl. *Huntington's disease*) je dědičné neurodegenerativní onemocnění. Lékař George Huntington poprvé popsal tuto nemoc, u které se v důsledku ztráty neuronů v *corpus striatum* projevuje zhoršující se pohyb, změna osobnosti a zejména výrazné narušení kognitivních funkcí. HD je autozomálně dominantní dědičné onemocnění. První příznaky onemocnění se projevují mezi 35. - 50. rokem života. Juvenilní forma se může projevit už před 20. rokem života. HD se vyvíjí v několik fází a bohužel většinou v intervalu 15 – 20 let od propuknutí prvních příznaků má fatální následky; u juvenilní formy je tento interval kratší (Koukolík a Jiráček, 1998; Marková a Hansíková, 2016; Raymond a kol., 2011).

HD je podmíněna mutací v genu HTT (též znám jako IT-15), který se nachází na krátkém raménku 4. chromozomu (4p16.3) a kóduje protein huntingtin (Htt). Mutace v prvním exonu pro huntingtin vyvolává abnormální prodloužení trinukleotidových CAG repetice, které kódují glutamin. Dochází k prodloužení polyglutaminového řetězce a ke změně struktury proteinu. Za fyziologických podmínek se u zdravých jedinců vyskytuje 9 až 36 CAG repetice, u nemocných je většinou překročen počet 37 těchto repetice (Marková a Hansíková, 2016; Raymond a kol., 2011).

Huntingtin je rozpustný protein o velikosti 348 kDa, má antiapoptické vlastnosti a při embryogenezi se podílí na vývoji nervové soustavy. Tento protein je v lidském těle vysoce exprimován a to nejvíce v neuronech centrální nervové soustavy a ve varlatech. V buňkách asociuje s mnoha proteiny i s organelami a účastní se mnoha buněčných procesů. V cytosolu ovlivňuje transport váčků a organel a v jádře reguluje transkripci některých genů, např. PGC1 $\alpha$  (transkripční faktor biogeneze mitochondrií) a BDNF (mozkový neurotrofický faktor). U mutovaného huntingtinu (mHtt) dochází ke ztrátě fyziologických vlastností a objevují se nové, které jsou naopak schopny poškodit buňky (Marková a Hansíková, 2016; Raymond a kol., 2011).

I přesto, že jsou známy jak gen, tak i mutace vyvolávající vznik HD, nejsou stále známy přesné mechanismy objasňující patogenezi tohoto onemocnění. Existuje, ale mnoho důkazů, které vedou k potvrzení, že porušený energetický metabolismus mitochondrií souvisí s patogenezi HD. Již mnohokrát bylo prokázáno, že dysfunkce mitochondrií a narůstající oxidační stres a řada neurodegenerativních onemocnění jsou úzce propojeny s řadou neurodegenerativních onemocnění. Na různých modelech i na člověku byla zjištěna porušená mitochondriální dysfunkce způsobená mHtt nejen v mozkové tkáni, ale i v periferních tkáních (např. svaly, fibroblasty, lymfocyty) (Marková a Hansíková, 2016).

### 1.2.5.2 Friedreichova ataxie

Friedreichova ataxie je autozomálně recesivně dědičné onemocnění, pro které je charakteristické opakování tripletů kódujících glutamin ve FXN (X25) genu na 9. chromozomu. Tato oblast DNA je zodpovědná za kódování bílkoviny frataxinu, která se účastní metabolismu železa v mitochondriích. U Friedreichovy ataxie se snižuje počet Purkyňových buněk a neuronů v *nucleus dentatus*, dochází k progresivnímu úbytku buněk v gangliích zadních kořenů míšních a zadních rozích míšních. Dalším znakem je úbytek velkých myelinizovaných axonů periferních nervů se sekundární miózou, atrofizace zadních provazců míšních, ventrálního i laterálního spinocerebelárního a kortikospinálního traktu. V klinickém obrazu se projevuje ataxie, dysartrie, spasticita dolních končetin, skolióza a autonomní potíže (Schwabová a kol., 2013).

### 1.2.6 Prionová onemocnění

Prionová onemocnění neboli transmisivní spongiformní encefalopatie (TSE) jsou vzácná neurodegenerativní onemocnění, jejichž vznik je zapříčiněn ukládáním patologicky změněného („infekčního“) prionového proteinu (PrP<sup>Sc</sup>) v mozkové tkáni. Genetické formy TSE způsobují patogenní variace (mutace) v PRNP genu, který se nachází na krátkém raménku 20. chromozomu (Rohan a kol, 2013).

Nejčastějším lidským prionovým onemocněním je Creutzfeldtova-Jakobova nemoc (CJN). V současné době rozlišujeme infekční, sporadickou a dědičnou podobu tohoto onemocnění. V různém rozsahu poškozuje mozkovou kůru a oblasti podkorové šedi. Projevuje se rychle progredující demencí a řadou neurologických příznaků. Priony (zkratka ze slov „*proteinaceous infectious particles*“), prionový protein (PrP) jsou malé proteinové částice, které neobsahují nukleové kyseliny. Pokud dojde ke kontaktu patogenního PrP<sup>Sc</sup> s tkáňovým PrP<sup>C</sup>, dojde k přeměně prostorové struktury PrP<sup>C</sup> na PrP<sup>Sc</sup>. Tato přeměna může být spontánní, jedná se tedy o sporadickou formu nebo je způsobena patogenní mutací prionového proteinového genu PRNP a v tomto případě se jedná o genetickou formu. Při prionových onemocněních dochází ke spongiformní dystrofii, numerické atrofii neuronů a glióze (Koukolík a Jiráček, 1998; Matěj a Rusina, 2012).

### **1.2.7 Onemocnění motorického neuronu**

Nejčastějším onemocněním motorického neuronu je amyotrofická laterální skleróza (ALS). Jedná se o rychle progredující neurodegenerativní onemocnění dospělých jedinců. Primárně jsou postiženy kortikální, bulbární a spinální motoneurony, kdy převažuje numerická atrofie velkých motorických neuronů předních rohů míšních a motorických neuronů jader hlavových nervů v mozkovém kmeni. Nejčastější příčinou předčasného úmrtí je respirační selhání. Etiologie onemocnění není zatím zcela objasněna, ale díky novým studiím byly objeveny genetické příčiny nejen u familiárních, ale i u sporadických forem. Zhruba v 96 % případech ALS jsou prokázány neuronální a gliové cytoplazmatické inkluze ubikvitinového proteinu TDP-43, které mohou být výsledkem předcházejících patofyziologických dějů. Tyto inkluze chybí u případů s prokázanou mutací genu pro superoxiddismutázu- 1 (SOD1) (Baumgartner a kol., 2017; Matěj a Rusina, 2012).

## 2. Mitochondrie

### 2.1 Struktura a funkce mitochondrií

Mitochondrie jsou semiautonomní organely, které jsou ohraničeny membránou a obsahují enzymatické systémy, s hlavní funkcí producenta energie pro buňky. Mitochondrie se vyskytují prakticky ve všech buňkách. Ve světelném mikroskopu jsou mitochondrie viditelné jako oválné až vláknité útvary v cytoplazmě. Jejich počet závisí na množství látkové výměny v buňce. Podle energetické potřeby jich může být v jedné buňce několik set až několik tisíc. Velikost, tvar a struktura mitochondrií jsou variabilní. Velikost se pohybuje od 0,2 do 2  $\mu\text{m}$  šířky a od 2 do 7  $\mu\text{m}$  délky. Tvar může být eliptický, sférický, ovoidní, diskoidní nebo vláknitý. Základní strukturou mitochondrií jsou dvě fosfolipidové membrány, které jsou od sebe vzdálené 8-10 nm. Mezi membránami se nachází mezimembránový prostor a uvnitř mitochondrie matrix. Vnitřní membrána vytváří krysty neboli záhyby. Vnější membrána obsahuje poriny, což jsou proteiny, které vytvářejí nesespecifické póry pro volnou difúzi molekul do velikosti 5 kDa. Vnitřní mitochondriální membrána udržuje iontové gradienty a je propustná pouze pro kyslík, oxid uhličitý a vodu. Mitochondrie v matrix obsahují enzymy, které se podílejí na oxidačním metabolismu eukaryotní buňky. Jedná se o enzym pyruvátdehydrogenázu, enzymy citrátového cyklu, enzymy katalyzující oxidaci mastných kyselin a enzymy a redoxní proteiny elektronového transportního řetězce a oxidační fosforylace. Dále jsou v matrix obsaženy substráty, nukleotidové kofaktory, anorganické ionty, mitochondriální DNA (mtDNA) a RNA (mtRNA) a ribozomy (Dylevský, 2000; Fišar a kol., 2011; Trojan a kol., 1996).

Nejdůležitější úlohou mitochondrií je produkce ATP (adenosintrifosfát) pomocí enzymů citrátového cyklu a oxidační fosforylace. Mitochondriální oxidační fosforylace spotřebuje více jak 80 % kyslíku a produkuje 92 % celkové buněčné energie. Mezi další důležité funkce mitochondrií řadíme produkci reaktivních forem kyslíku (ROS), regulaci nitrobuněčného vápníku, spouštění apoptózy, vývojovou a synaptickou plasticitu a termogenezi. Mitochondrie jsou schopny zachytit energii uvolněnou během oxidačních procesů a zároveň tvořit makroenergetické vazby ATP. ATP je pomocí translokace extramitochondriálně transportován a difunduje do oblasti buňky, kde je využíván (Dylevský, 2000; Fišar a kol., 2011; Trojan a kol., 1996).



### **2.1.1 Mitochondriální DNA**

Lidská mitochondriální DNA (mtDNA) je cirkulární dvouřetězcová molekula skládající se z 16569 párů bazí. Obsahuje 37 genů, z toho 13 genů kóduje proteiny, 22 genů kóduje transferovou RNA a 2 geny kódují ribozomální RNA. Všech 13 genů kódující proteiny se nachází v dýchacím řetězci, který je lokalizován na vnitřní mitochondriální membráně (Federico a kol., 2012).

V současnosti je známo více než 300 mitochondriální mutací souvisejících s různými chorobami. Mitochondriální dysfunkce jsou také popisovány u neurodegenerativních onemocnění. Společným rysem mitochondriálních poruch je poškozený dýchací řetězec nebo snížení činnosti mitochondrií. Mutace mtDNA jsou buď sporadické, nebo maternálně zděděné oproti jaderné DNA, kde platí Mendelovy zákony dědičnosti (Federico a kol., 2012).

Mitochondriální DNA je podobná bakteriální DNA a její genetická informace je odlišná od informace jaderné DNA, a z tohoto důvodu nedostačuje pro autonomní funkce mitochondrií a jejich dělení (Trojan a kol., 1996).

## **2.2 Mitochondrie a oxidační stres**

### **2.2.1 Volné radikály a oxidační stres**

Mitochondrie jsou považovány za „elektrárny“ buněk, protože vytvářejí energii v podobě ATP pro různé reakce v buňce. Mitochondrie zprostředkovávají metabolismus pomocí přeměny pyruvátu a jiných metabolitů v cyklu kyseliny citronové, účastní se metabolismu močoviny, syntézy steroidů, aj. Dále jsou zapojeny do produkce tepla, uskladnění vápenatých iontů, regulace membránového potenciálu a procesu programované buněčné smrti (apoptózy) (Akbar a kol., 2016; Cadenas a Davies, 2000).

Za fyziologických podmínek uniká z elektronového transportního řetězce méně než 2 % kyslíku. Nicméně je známo, že větší množství ROS je za patologických stavů produkováno porušenými mitochondriemi. Dále jsou mitochondrie schopné produkovat reaktivní formy dusíku (RNS), mezi které patří oxid dusnatý (NO). Kombinací ROS a RNS vzniká peroxynitrit (ONOO<sup>-</sup>). Peroxynitrit způsobuje nitraci tyrosinových nebo tryptofanových zbytků a S-nitrosylaci cysteinových zbytků mitochondriálních proteinů, které způsobují jejich inaktivaci a mitochondriální dysfunkci, což může vyústit v buněčnou smrt a poškození orgánů. Předpokládá se, že oxidační stres a mitochondriální dysfunkce způsobují vznik a zhoršení mnoha neurodegenerativních onemocnění, jako je například AD, PD, HD, dále

alkoholová demence, reperfuční poškození mozku způsobené ischemií a traumatické poškození mozku. Všechna tato onemocnění mají různé příčiny vzniku, ale jejich společným jmenovatelem jsou posttranslační změny proteinů, které jsou způsobeny zvýšeným oxidačním stresem a mitochondriálními dysfunkcemi. Mezi posttranslační modifikace řadíme oxidaci, nitraci, acetylaci, hyperfosforylaci, glykosylaci a tvorbu různých proteinových adduktů. Zvýšená produkce ROS a RNS vede ke vzniku oxidačního stresu v buňkách. Nicméně buňky obsahují obranné enzymy a antioxidanty, které jsou schopny se proti oxidantům chránit (Akbar a kol., 2016).

Výše zmíněné antioxidanty se dělí na enzymatické a neenzymatické. Enzymatické antioxidanty se v živých organismech vyskytují ve čtyřech základních antioxidačních systémech. Do této skupiny řadíme superoxiddismutázu, glutathionperoxidázu a koenzym Q10 a dále také katalázu, xanthinoxidázu, železo a měď, které jsou schopny eliminovat vliv iontů přechodných prvků a slouží jako první obrana proti ROS. Jsou schopné přeměnit ROS na neaktivní molekuly nebo na méně reaktivní molekuly (Akbar a kol., 2016; Opletal a kol., 2013).

Druhou skupinou jsou neenzymatické antioxidanty představované glutathionem, vitaminy C, A a E, selenem, bilirubinem, transferinem, feritinem a ceruloplasminem. Tyto malé molekuly jsou schopny přímými nebo nepřímými mechanismy zneškodnit ROS nebo RNS (Akbar a kol., 2016; Opletal a kol., 2013).

Antioxidanty se nacházejí také v rostlinách, ovoci, zelenině a v oříšcích. Rostlinné antioxidanty jsou polyfenoly, fytoestrogeny, flavonoidy, anthokyany a další. Příkladem polyfenolů a antioxidantů odvozených z rostlinných zdrojů jsou flavonoidy, kurkumin, taniny (trísloviny), deriváty kyseliny skořicové, kofein, deriváty kyseliny gallové, katechiny, deriváty kyseliny salicylové, antokyany, lutein, resveratrol a další. Mezi rostlinné nefenolické sloučeniny s antioxidačními účinky patří kyselina  $\alpha$ -linolenová, kyselina eikosapentaenová, kyselina dokosaheptaenová, karotenoidy, retinol, melatonin a další (Akbar a kol., 2016).

Mitochondrie jsou hlavním zdrojem buněčných ROS. Nejvýznamnějšími místy, kde dochází k tvorbě superoxidu, jsou komplexy I a III elektronového transportního řetězce. Membránový potenciál ovlivňuje rychlost produkce ROS. Tvorba ROS je inhibována při kyselém pH. Ke zvýšené tvorbě superoxidu dochází při nedostatečné produkci ATP mitochondriemi a dále pokud mají mitochondrie zvýšený poměr redukováného a neredukovaného nikotinamidadenindinukleotidu nebo koenzymu Q (Cadenas a Davies, 2000; Fišar a kol., 2011).

Manganová superoxididismutáza, která se nachází v matrix mitochondrie, přemění superoxid na peroxid vodíku ( $H_2O_2$ ).  $H_2O_2$  přechází do cytosolu a jádra kde jej glutathionperoxidáza a kataláza konvertují na vodu. Při reakci superoxidu s oxidem dusnatým vzniká peroxynitrit. Rozkladem peroxynitritu a Fentonovou reakcí vzniká vysoce reaktivní hydroxylový radikál  $OH\cdot$ , který může poškozovat neurony. Rovnice Fentonovy reakce:  $Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH\cdot + OH^-$ . V mitochondriích se nacházejí i antioxidanty, např. koenzym Q10, kreatin a nikotinamid. Při porušeném energetickém metabolismu nebo při neurotoxicitě, která je způsobena glutamátem, dochází k poškození mitochondrií prostřednictvím ROS, které vytvářejí samy mitochondrie. Je možné odlišit ROS vyprodukované, uvolněné a vycyтанé obranným systémem mitochondrií. ROS způsobují poškození mitochondriálních proteinů, membrán a mtDNA, dále dochází ke snížení syntézy ATP, což vede k poškození metabolických funkcí. Při apoptóze a nekroze se významně zvyšují ROS. ROS také zvyšují propustnost vnější mitochondriální membrány. Peroxynitrit je zodpovědný za toxický účinek oxidu dusnatého, který působí na mitochondrie v mozku za fyziologických, ale i patologických stavů (Aruoma, 1998; Fišar a kol., 2011).

## **2.2.2 Důsledky zvýšeného oxidačního stresu**

### **2.2.2.1 Změny tvaru a funkce mitochondrií**

Mitochondrie jsou dynamické organely, které podléhají dělení a fúzi. Fúze slouží k ochraně nadměrné degradace mitochondrií, zabraňuje autofágii a zachraňuje poškozené mitochondrie. Mitochondriální dělení zahajuje cytosolový Drp (protein příbuzný dynaminu), který je transportován do mitochondrií a hraje významnou roli v mitochondriální kontrole kvality a bioenergetice. Výsledkem dělení jsou dvě dceřiné mitochondrie, které jsou podrobeny buď dalšímu dělení, nebo jsou eliminovány autofágií. Mitochondrie s vyšším membránovým potenciálem podstoupí fúzi, zatímco druhá depolarizovaná dceřiná mitochondrie s dysfunkčními sloučenými proteiny je eliminována autofágií. Přesto u určitých onemocnění dochází k nerovnováze mezi dělením a fúzí, což vede k prodloužení a nadměrné fragmentaci mitochondrií a následně i k narušení normálních funkcí mitochondrií. Například mitochondriální fúzi zprostředkovávající mitofusin 2 (Mfn-2) je důležitý pro správný vývoj a udržování granulárních buněk mozečku. Vznik mutace v Mfn-2 způsobuje rozvoj axonální poruchy Charcot-Marie-Tooth (CMT) typu 2A. Tato dědičná periferní neuropatie způsobuje poškození motorických i senzitivních neuronů. Vlivem oxidačního stresu, který je vyvolán neurotoxickým glutamátem, dochází k přesunu mitochondriálního fúzního proteinu OPA1

(*fusion protein opticatrophy 1*) z vnitřního povrchu membrány do cytosolu, kde nadto může být současně uvolňován cytochrom c. Tyto jevy jsou doprovázeny mitochondriální fragmentací a apoptózou HT22 buněk (linie hipokampálních neuronů), zatímco antioxidant tokoferol (vitamín E) se snaží zabránit těmto pochodům. Na základě experimentů na krysích modelech, kde byly primární neuronové buňky vystaveny ischemicko-reperfuznímu hypoxickému poškození, lze říci, že oxidační stres se podílí jak na regulaci mitochondriálního dělení a fúzi, tak na buněčné smrti (Akbar a kol., 2016; Cadenas a Davies, 2000).

Výše zmíněný protein OPA1 je důležitý pro udržení struktury krist a struktur elektronového transportního řetězce. Protein OPA1 je také schopen reagovat pomocí oligomerizace na měnící se dostupnost živin. Při vyčerpání živin OPA1 ztenčuje stěnu krist a zvyšuje syntézu ATP a spotřebu kyslíku, což podporuje syntézu ATP a přežití buněk. OPA1 interaguje s podjednotkami ATP syntázy a s mitochondriálními přenašečovými proteiny z rodiny SLC25A a díky těmto interakcím OPA1 reguluje stěnu krist a množství syntézy ATP v mitochondriích (Germain, 2015).

Dalším mechanismem, který reguluje dělení mitochondrií, je aktivní přechod mitochondrií do cytosolu pomocí dyneinové a kinesinové dráhy. Řada prací potvrdila, že změněný mitochondriální přenos a změněná dynamika dělení a fúze se vyskytují právě u neurodegenerativních onemocnění i CMT. Podobně mitochondriální dysfunkce také souvisejí s procesem stárnutí a to z důvodu nahromadění poškozené nebo mutované mDNA vznikající kvůli zvýšenému či déle trvajícím oxidačnímu stresu. Axonální degenerace u CMT je dalším příkladem, kdy axonální mitochondrie nejsou schopné zabezpečit bioenergetický metabolismus s abnormální homeostázou  $Ca^{++}$  a proteázovou aktivitou. Počet mitochondrií je regulován autofágií, kdy poškozené a depolarizované mitochondrie jsou obklopeny autofágovými vakuolami a jsou následně eliminovány v lysozomech (Akbar a kol., 2016).

### **2.2.2.2 Postranlační modifikace mitochondriálních proteinů**

V důsledku modifikace mitochondriálních proteinů může docházet k inaktivaci těchto proteinů. Tato inaktivace přispívá ke vzniku poškození mitochondriálních funkcí, vyčerpání ATP a vede k procesům nekrózy a apoptózy. Za patologických stavů a vlivem oxidačního stresu a neurotoxických látek v mozku vzrůstá množství superoxidu ( $O^{2-}$ ) a dochází k produkci NO. Výskyt superoxidu a NO může vést ke vzniku cytotoxických sloučenin peroxinitritu ( $ONOO^-$ ) a peroxinitritové kyseliny ( $ONOOH$ ), které mohou způsobit smrt mozkových buněk. Vzhledem k tomu, že mozek obsahuje oproti jiným tkáním relativně nízké

množství glutathionu a jiných energetických substrátů, je proto ve srovnání s jinými tkáněmi citlivější k oxidačnímu poškození (Akbar a kol., 2016).

NO je v mozku produkován za fyziologických i patologických dějů. Buněčný NO je syntetizován z L-argininu pomocí NOS isoenzymů, které vyžadují pro svoji aktivitu přítomnost NADPH a kyslíku. Rozlišujeme tři isoformy NOS, neuronální (cNOS nebo nNOS), endoteliální (eNOS) a inducibilní (iNOS) syntázu. Isoformy nNOS a eNOS jsou závislé na komplexu  $Ca^{++}$ -kalmodulin. Oproti tomu iNOS je na vápníku nezávislá a za fyziologických podmínek se v těle nevytváří. Je však rychle aktivována zánětem a oxidačním stresem v různých tkáních včetně v makrofázích, mikroglíích, astrocytech, neuronech, v bílých a červených krvinkách, destičkách a dalších. V mozku působí NO již v malých koncentracích jako neuropřenašeč. Pokud je NO produkován ve zvýšené míře iNOS a nNOS, např. při zánětlivých onemocněních, může působit toxicky na mozkovou tkáň nitrací proteinů v neuronech a tím způsobovat buněčnou smrt a vážná tkáňová poškození. Zvýšené množství NO může např. zapříčinit ischemické poškození mozku nebo mnoho jiných onemocnění nervového systému (Akbar a kol., 2016).

Peroxidace lipidů a poškození DNA vede ke zvýšení oxidačního stresu a tím je podporován mechanismus oxidativní modifikace cysteinu, methioninu a jiných aminokyselin v proteinech. S-nitrosylace je reverzibilní modifikace cysteinových zbytků v proteinech a při níž dochází k produkci nitrosothiolů, které působí na přežití buněk pomocí změn v genové transkripci, vezikulárním transportu, receptoru zprostředkovávajícím signál pro transdukcii a apoptózu v závislosti na množství ROS/RNS. Důležitějším zjištěním je, že neuroprotektivní proteiny jako je parkin a XIAP jsou modulovány S-nitrosylací, která je schopna potlačit jejich funkci a vyvolat buněčnou smrt (Akbar a kol., 2016; Stram a Payne, 2016).

Fosforylace je dalším typem posttranslační modifikace, která reguluje řadu proteinů pomocí fosforylace a defosforylace proteinových kináz a fosfatáz. Působení exogenních faktorů, včetně neurotoxických látek, může měnit aktivitu těchto proteinových kináz a fosfatáz. Do proteinkináz zahrnujeme cAMP-dependentní kinázu A (PKA), fosfatidylinositoltrifosfát-dependentní kinázu (PI-3K), proteinkinázu B (PKB), proteinkinázu C (PKC), kalcium-kalmodulin-dependentní proteinkinázu (CAMK), glykogensyntázu-kinázu  $3\beta$ , tyrozinkinázy, mitogenem aktivované proteinkinázy (MAPKs) zahrnující c-Jun N-terminální kinázu (JNK) a p38 kinázu. Aktivity těchto enzymů se mění při patologických stavech včetně neurodegenerativních onemocnění (Akbar a kol., 2016; Stram a Payne, 2016).

### 2.2.2.3 Mechanismy buněčné smrti při zvýšeném oxidačním stresu

Zvýšený oxidační stres může vyvolat buněčnou smrt způsobenou MAPKs, kam řadíme JNK a p38K a tím přispívat k smrti neuronů a k rozvoji neurodegenerativních onemocnění. Zvýšená hladina peroxynitritu může aktivovat poly(ADP-ribóza) polymerázu (PARP-1) a způsobit změny v propustnosti mitochondrií. Poškozená DNA aktivuje PARP-1 a tím je vyvolána na kaspázách závislá buněčná smrt s ischemií a průvodním zánětem (Akbar a kol., 2016).

## 2.3 Mitochondrie a excitotoxicita

Mitochondrie produkují snížené množství ATP, které může být způsobeno např. ischemií nebo chronickým stresem. Porušená funkce  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPáz způsobuje narušení iontových transmembránových gradientů. Zvýšená koncentrace  $\text{K}^+$  vyvolává depolarizaci membrán a obrácenou funkci přenašečů pro aminokyseliny. Dochází k aktivaci napětově řízených (VOC) i ligandem řízených (ROC)  $\text{Ca}^{++}$  kanálů a zvyšuje se koncentrace  $\text{Ca}^{++}$  v cytosolu. Nitrobuněčné  $\text{Ca}^{++}$  působí na zvýšení koncentrace excitačních aminokyselin v mimobuněčném prostoru. Zvyšuje se koncentrace především glutamátu a díky obrácenému směru přenosu dochází k šíření neurotoxicity. Zvýšenou synaptickou koncentraci glutamátu může vyvolat jeho uvolňování z astrocytů pomocí na  $\text{Ca}^{++}$  závislé exocytóze nebo inhibice EAAT (membránové přenašeče excitačních aminokyselin) v gliových buňkách. Vazba glutamátu k NMDA a AMPA receptorům vyvolá nadměrný influx  $\text{Ca}^{++}$  do buňky, vápník aktivuje fosfolipázy, proteázy a endonukleázy, které svým působením narušují membrány, proteiny a nukleové kyseliny zajišťující buněčnou integritu. Např.  $\text{Ca}^{++}$  aktivovaná fosfolipáza  $\text{A}_2$  ( $\text{PLA}_2$ ) uvolňuje z membrán kyselinu arachidonovou, která pomocí cyklooxygenázové a lipoxygenázové dráhy aktivuje produkci superoxidu. Vysoké nitrobuněčné koncentrace  $\text{Ca}^{++}$  způsobují přetížení mitochondriálního  $\text{Ca}^{++}$ , dále zvýšenou produkci ROS a inhibici produkce ATP. Obecně lze říci, že hlavní příčinou poškození mitochondrií je nedostatečná produkce ATP. Vstup iontů  $\text{Na}^+$  a  $\text{Ca}^{++}$  přes chronicky aktivované NMDA a AMPA receptory spouští aktivaci  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPáz a  $\text{Ca}^{++}$ -ATPáz, které se poté podílejí na excitotoxicitě. Při excitotoxické nekróze dochází k nekontrolovatelnému vstupu  $\text{Na}^+$ , který způsobuje nabobtnání a lýzu buňky. Podle nedávných studií bylo prokázáno, že glutamátem způsobená smrt neuronů souvisí s apoptózou. Díky vysoké koncentraci glutamátu může být apoptóza spuštěna mechanismy závislých nebo nezávislých na kaspázách. Aktivované kaspázy-3 potlačují aktivitu  $\text{Ca}^{++}$  pumpy v plazmatické membráně a toto způsobí

další přetížení nitrobuňčného  $\text{Ca}^{++}$ . Proti neurotoxicitě neuronů působí na ATP závislé sodíkové a vápníkové pumpy, exprese proteinů, které váží  $\text{Ca}^{++}$  a neurotrofní faktory působící na NMDA receptory, antioxidační enzymy a antiapoptické proteiny (Fišar a kol., 2011; Matson a kol., 2008).

### **2.3.1 Úloha vápenatých iontů v mitochondriích**

Mitochondrie a endoplazmatické retikulum vycytávají cytozolový vápník. Vnější mitochondriální membrána je propustná pro  $\text{Ca}^{++}$  a vnitřní membrána obsahuje přenašeče  $\text{Ca}^{++}$ . Obsahuje uniportér pro přenos  $\text{Ca}^{++}$  do matrix a antiportéry  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$  a  $\text{H}^+/\text{Ca}^{++}$  pro přenos  $\text{Ca}^{++}$  v opačném směru. Zvýšený přísun  $\text{Ca}^{++}$  do mitochondrií způsobuje depolarizaci a změnu propustnosti membrán, dojde k zastavení syntézy ATP a začnou se uvolňovat různé molekuly i látky aktivující apoptózu. Po působení oxidačního stresu nebo vysokých koncentrací  $\text{Ca}^{++}$  dochází k otevření pórů ve vnitřní membráně. Tímto otevřením pórů dochází k nabobtnání mitochondrií a ke ztrátě elektrochemického potenciálu (Fišar a kol., 2011).

## **2.4 Mitochondrie a apoptóza**

Programovaná buněčná smrt (PCD) má významnou roli ve vývoji i v normální buněčné homeostáze. Apoptóza je formou PCD projevující se změnami v morfologii buňky svráštěním, degradujícím cytoskeletem a vytvářením váčků v cytoplazmatické membráně. Dále dochází ke kondenzaci chromatinu a fragmentaci jádra a v konečné fázi se buňka rozpadá na apoptická tělíška. Také dochází k přesunu fosfatidylserinu z vnitřního na vnější povrch membrány, k poruše propustnosti mitochondriální membrány a k uvolnění cytochromu c. Porušená regulace těchto procesů je známa u řady onemocnění a to i u neurodegenerativních onemocnění. Apoptózu u savců způsobují kaspázy. Za smrt neuronů jsou zodpovědné především kaspázy 9 a 3 (Fišar a kol., 2011; Matson a kol., 2008).

Mitochondrie jsou důležitým činitelem apoptózy, neboť vnitřní signální cesta apoptózy je spouštěna právě v mitochondriích. Pokud jsou mitochondriální apoptické kaskády aktivovány lokálně v synapsích a dendritech, hovoříme o tzv. synaptické apoptóze (Fišar a kol., 2011; Matson a kol., 2008).

## 2.5 Mitochondrie a nervový systém

### 2.5.1 Neurony

Neuron neboli nervová buňka je funkční a anatomickou jednotkou nervového systému. Základní funkcí neuronu je přijmout, vést, zpracovat a odpovědět na přicházející signály. Neuron se skládá z těla (soma, perikaryon) a výběžků. Dostředivé výběžky (aferentní), které přijímají informace, se nazývají dendrity. Odstředivé výběžky (eferentní), které vedou vzruch na další neuron nebo efektorovou tkáň, se nazývají axony (neurity). Přenos informací je v nervovém systému uskutečňován kooperací akčního a synaptického potenciálu. Akční potenciál vzniká na základě změny polarizačního napětí na nervových membránách, synaptický potenciál vzniká prostřednictvím mediátorů (neurotransmiterů). Neurotransmitery jsou specifické molekuly, které jsou uvolňovány v presynaptické části do synaptické štěrbině (Mourek, 2012).

### 2.5.2 Neuroglie

Dalším typem buněk vyskytující se v nervovém systému jsou gliové buňky, které plní v nervovém systému podpůrnou funkci. Do gliových buněk zahrnujeme astrocyty, mikroglie, oligodendroglie a ependymové buňky. Astrocyty pomocí svých dlouhých výběžků přiléhají ke kapilárám a spolu s nimi vytvářejí hematoencefalickou bariéru. Mikroglie mají schopnost fagocytovat a tím se účastní obranných mechanismů v nervové tkáni. Oligodendroglie se společně se Schwanovými buňkami na periférii podílejí na tvorbě myelinových pochev axonů. Ependym vytváří výstelku dutin centrálního nervového systému a s cévami vytváří *plexus choroideus*, ve kterém se tvoří mozkomíšní mok (Mourek, 2012).

### 2.5.3 Úloha mitochondrií v nervovém systému

Mitochondrie vyrábějí ATP prostřednictvím oxidační fosforylace. ATP je důležitá molekula pro spoustu buněčných dějů, jako je například buněčné dýchání a buněčná signalizace. Mitochondrie se dále podílejí na syntéze dalších molekul, odpovídají na oxidační stres a dále se účastní apoptózy a buněčného dělení a fúze. Nervový systém je na mitochondriích zcela závislý, neboť potřebuje ke své správné funkci spoustu energie. Mutace v mitochondriálním genomu, poškození mitochondriální rovnováhy, tvorba a přítomnost ROS, agregace proteinů a vlivy vnějšího prostředí ovlivňují energetický metabolismus a často se vyskytují u neurodegenerativních onemocnění (Federico a kol., 2012).



Při nefunkční mitochondriální bioenergetice nejsou neurony schopny využívat glykolýzu k tvorbě ATP. Při zástavě mitochondriálního dýchání neurony rychle umírají. Během metabolismu glukózy v neuronech vzniká v pentosofosfátovém cyklu redukovaný nikotinadenin dinukleotidfosfát (NADPH). NADPH má důležitou funkci v regeneraci glutationu a dalších složek obranného systému chránící buňky před oxidačním stresem. Může tak působit přímou neutralizací ROS nebo nepřímo přes exogenní antioxidanty, např. vitamín C a E. Antioxidanty také mohou zvýšit produkci ATP působením na komplex I a III v elektronovém transportním řetězci a tím působit na buňky neuroprotektivně (Fišar a kol., 2011).

## **2.5.4 Úloha neuroplasticity v nervovém systému**

### **2.5.4.1 Neuroplasticita neuronů**

Neuroplasticita je základní proces adaptace neuronů. Neuroplasticita v dospělém mozku obsahuje změny dendritických funkcí, reorganizaci synapsí, růst a větvení dendritů a axonu, synaptogenezi a neurogenezi. V dospělém mozku probíhá neurogeneze především v hipokampu. Neurogeneze byla zjištěna i v dalších oblastech mozku, například v *bulbus olfactorius* a mozečku. Hustota, velikost a tvar dendritických trnů se významně podílejí na synaptické plasticitě a síle synapsí. Do synaptické funkce lze zahrnout i obousměrnou komunikaci mezi neurony a astrocyty (Fišar a kol., 2011).

Synaptická plasticita znamená vývoj nových synapsí, změny ve funkci existujících synapsí i eliminaci synapsí. Tyto procesy jsou neurobiologickým základem učení a paměti (Fišar a kol., 2011; Cheng a kol., 2010).

### **2.5.4.2 Poškození neuroplasticity**

Mozková tkáň je velice citlivá na oxidační poškození. V neuronech postihuje oxidační poškození nejčastěji báze DNA. Opravu oxidačního poškození zajišťuje vyštěpovací oprava báze (BER, „*base exciton repair*“). Snížená funkce BER v mozkových buňkách může být jedním z důvodů normálního stárnutí buněk, ale i příčinou neurologických abnormalit způsobující AD nebo PD (Fišar a kol., 2011; Cheng a kol., 2010; Matson a kol., 2008).

Stres může působit na neuroplasticitu a tím může dojít ke změně funkcí různých mozkových struktur. Nejvíce je prostudován vliv stresu na synaptickou a morfologickou plasticitu hipokampu. Hipokampus je důležitý pro učení a paměť a díky vysokému množství glukokortikoidních receptorů je velice citlivý na stres. Akutní a chronický stres se ve svých účincích na neuroplasticitu liší. Mírný stres po krátkou dobu způsobuje podporu synaptické

plasticity v hipokampu a zvýšení poznávacích schopností. Při těžkém a dlouhotrvajícím stresu působí na neuron škodlivé procesy, které jsou způsobeny buď přímým efektem kortizolu, nebo zvýšenou neurotoxicitou jiného původu. U experimentálních zvířat i u lidí bylo potvrzeno, že chronický stres nebo dlouhodobě zvýšená hladina glukokortikoidů poškozuje na hipokampu závislou paměť a také dochází k poškození morfologické plasticity hipokampu. Podobně jako na hipokampus může chronický stres působit i na neuroplasticitu prefrontální kůry. Lze předpokládat, že účinky stresu budou na různé oblasti mozku rozdílné (Fišar a kol., 2011).

Chronický stres dále navozuje glutamaterní neurotoxicitu, změny v nitrobuněčných signálních drahách a sníženou expresi nervových růstových faktorů. Ke zvýšené syntéze glutamátu dochází především v oblasti hipokampu a v prefrontální kůře. Zvýšená aktivita glutamátu způsobuje zvýšení cytosolového vápníku, zvýšenou aktivaci enzymů závislých na  $Ca^{++}$ , degradaci cytoskeletu a buněčných proteinů a také zvýšenou tvorbu volných kyslíkových radikálů. Tyto procesy mohou v konečném důsledku vést k atrofii nebo k smrti neuronů. Proti tomuto poškození neurony spouští řadu obranných mechanismů. Akutní stres působí na mitochondriální biogenezi a na enzymovou aktivitu během oxidační fosforylace. Chronický stres oproti tomu způsobuje porušení biogeneze, dysfunkci dýchacího řetězce, sníženou produkci ATP a zvýšení RONS, peroxidaci lipidů, poškození mitochondriální i jaderné DNA a zvýšení rizika apoptózy a nekrózy. Translokační protein, který byl dříve označován jako periferní benzodiazepinový receptor se může podílet na řadě různých stresových reakcí, např. v sympatoadrenomedulárním systému, renin-angiotensinovém systému a dalších. Tento translokační protein se nachází na vnější mitochondriální membráně a v CNS se nachází hlavně v gliových buňkách. Účastní se regulace biosyntézy steroidů a buněčných metabolických procesů a podílí se i na některých neurodegenerativních onemocněních a na psychiatrických poruchách souvisejících se stresem (Fišar a kol., 2011; Cheng a kol., 2010; Matson a kol., 2008).

### **3. Mitochondriální dysfunkce u vybraných neurodegenerativních onemocnění**

Na vzniku mitochondriálních dysfunkcí se podílejí genetické faktory jaderného i mitochondriálního prostředí, jako je například životní styl, stárnutí, toxické látky. Při dělení mitochondrií dochází ke stochastickému rozdělení kopie mtDNA mezi dvě nové mitochondrie. Je-li počet poškozených kopií mtDNA nízký, mohou být tyto kopie obsaženy pouze v jedné nové mitochondrii. Toto rozdělení se nazývá heteroplazmická mutace. Ke klinickým projevům mutace mtDNA dochází tehdy, když podíl poškozených molekul mtDNA přesáhne prahovou hodnotu (Fišar a kol, 2011).

Oxidační stres spolu s porušenou apoptózou jsou zodpovědné za vznik neurodegenerativních onemocnění. Nervový systém je závislý na energii vznikající v mitochondriích. Díky tvorbě ROS a vlivům vnějšího prostředí vznikají mutace v mtDNA, které vedou k poklesu energie a vzniku neurodegenerativních onemocnění. Mitochondriální dysfunkce způsobují poškození a delecí mtDNA, oxidační stres, změny v dělení a spojování mitochondrií, porušení kalciové homeostázy. Tyto uvedené faktory mohou vést až ke smrti neuronu. Vliv mitochondriálních dysfunkcí se podílí na patogenezi AD, PD a HD, amyotrofické laterální sklerózy, bipolární afektivní poruchy a také schizofrenie, depresivní poruchy a iktu (Bhat a kol., 2015; Fišar a kol., 2011).

Podle novějších studií souvisejí mutace mtDNA s řadou neurologických onemocnění, jako je například syndrom mitochondriální encefalomyopatie, laktátová acidóza a iktu podobné příhody, které se projevují myoklonickými záchvaty a encefalopatií. Dále se vyskytují také u sekundárních neuropsychiatrických projevů, mezi něž patří bolesti hlavy, deprese, kognitivní poškození. Mitochondriální dysfunkce ovlivňují v první řadě signální cesty zprostředkované vápníkem a tím mohou vést k poruchám nervových buněk v různých částech mozku. Lze proto očekávat, že mitochondriální dysfunkce jsou společným faktorem pro vznik migrény s těžkou depresivní poruchou, bipolární afektivní poruchy, panické poruchy a sociální fobie, které se vyskytují dvakrát častěji společně s migrénou než bez ní. Mitochondriální dysfunkce jsou také spojeny s inzulínovou rezistencí a metabolickým syndromem. Metabolický syndrom může být doprovázen příznaky deprese (Fišar a kol., 2011).

### 3.1 Alzheimerova nemoc (AD)

Klinicky je AD popisována jako postupná a progresivní ztráta paměti a kognitivních funkcí (např. emoční kontroly a schopnosti řešit každodenní problémy). Onemocnění začíná degenerací neuronů, která má za následek úbytek mozkové hmoty. Postupující degenerací neuronů dochází ke snížení mitochondriálních funkcí a ke ztrátě synaptických spojení. Při AD dochází k tvorbě plaku vně nervové buňky a uvnitř neuronu se tvoří neurofibrilární smotky. Stárnutí sice představuje rizikový faktor AD, ale nesmí se opomenout vliv genetiky, životního stylu a vnějšího prostředí. Dalšími riziky mohou být onemocnění koronárních tepen, vysoký krevní tlak, mrtvice a vysoká hladina cholesterolu v krvi aj. Navíc lze změny typické pro AD zaznamenat i v nižších věkových kategoriích (Akbar a kol., 2016; Wang, 2014).

Současné studie uvádějí, že metabolický syndrom, do kterého řadíme např. cukrovku a obezitu s inzulínovou rezistencí, může mít významnou roli při vzniku sporadické formy AD. Z těchto důvodů pak převládá názor, že vaskulární a metabolické dysfunkce a selhávání funkce mitochondrií přispívají ke vzniku tohoto onemocnění. Do vaskulárních poruch zahrnujeme snížený průtok krve mozkem, porušení hematoencefalické bariéry a mozkovou amyloidní angiopatii. Výše bylo zmíněno, že selhání mitochondrií vede k porušené homeostáze  $\text{Ca}^{++}$  a ke zvýšené produkci ROS. Mitochondrie udržují správnou hladinu cytosolového  $\text{Ca}^{++}$  součinností mitochondriálního  $\text{Ca}^{++}$  uniportu a  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$  a  $\text{H}^+/\text{Ca}^{++}$  antiportu. Zvýšená akumulace kationtů v mitochondriích spouští zvýšení hladiny cytosolového vápníku. Vápník se v nervové soustavě podílí na správné neurotransmisii, plasticitě a regulaci genové transkripce. Dysregulace homeostázy vápníku vede k excitotoxicitě a souvisí i se vznikem neurodegenerativních změn (Akbar a kol., 2016; Wang, 2014).

Strava s vysokým obsahem tuku a se zvýšeným příjmem cukrů v kombinaci se sedavým způsobem života přispívají k poklesu kognitivních funkcí. Olovo vyskytující se v životním prostředí hraje významnou roli ve vzniku amyloidózy, která vzniká kombinací mutovaných a poškozených genů, jako je například APP gen. Expozice olovem vede k metylaci APP genu. S pozdějším nástupem AD souvisejí apolipoprotein E4 a další varianty apolipoproteinu E (ApoE). Tvorba 8-hydroxyguaninu pomocí olova vede ke vzniku jedné nebo více CpG (cytosin a guanin) skupinám v genu pro ApoE, který je zodpovědný za tvorbu amyloidu z APP. Toxický efekt olova na mozkovou tkáň je způsoben oxidačním stresem, který zvyšuje tvorbu amyloidu z APP genu a nakonec se hromadí v mozku v podobě amyloidových plaků. Dalším kovem s možným podílem na vzniku neurodegenerativních onemocnění, je měď.

Mezi  $\beta$ -amyloidem a mědí je silná afinita, která způsobí konformaci amyloidu do  $\beta$ -skládaného listu za účelem dosáhnout vysoké afinity  $\beta$ -amyloidu k mědi. U pacientů s AD se vyskytovala vysoká koncentrace mědi v senilních placích a v mozkomíšním moku. Ionty  $\text{Cu}^{++}$  váží  $\beta$ -amyloid a tím dochází k narušení neurofibril. Následuje ztráta synapsí, což vede k poruchám paměti a poklesu mozkové činnosti (Akbar a kol., 2016; Wang, 2014).

Je prokázáno, že významnou roli při vzniku AD má pohlaví s vyšší zranitelností u žen. Důvodem proč jsou ženy v pozdějším věku náchylnější k rozvoji onemocnění, může být ztráta ochranného vlivu estrogenu proti mitochondriálnímu poškození. Navíc jednotlivci s různými variacemi v určitých genech jsou čtyřikrát náchylnější k rozvoji AD (Akbar a kol., 2016; Wang, 2014).

### **3.1.1 Alzheimerova nemoc a oxidační stres**

Je známo, že oxidační stres hraje významnou roli ve vzniku a progresi AD, protože vyvolává řadu posttranslačních modifikací proteinů, oxidační poškození DNA a peroxidaci lipidů. Tyto skutečnosti byly pozorovány již i u pacientů s mírným poškozením kognitivních funkcí. Mitochondriální dysfunkce a akumulace tranzitivních kovů vedou ke zvýšené produkci ROS a k hromadění  $\beta$ -amyloidu a tau proteinu, které přispívají k redoxní nerovnováze a neurotoxicitě. Bez ohledu na různé rizikové faktory je mitochondriální dysfunkce považována za nejvýznamnější znak poškozených neuronů v mozku pacientů s AD. U AD rozlišujeme dvě formy, sporadickou a dědičnou. U dědičné formy AD se nachází mutace alespoň v jednom ze tří genů pro APP. Ačkoliv se zatím vyskytuje málo informací o vzniku sporadické formy, je přesto známo, že jedním z rizik vzniku onemocnění je oxidační poškození nervových buněk spojené s věkem. ROS obecně stimulují transkripci prozánětlivých mediátorů a zvyšují hladinu cytokinů, jako jsou např. IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  a chemokinů, které způsobují zánět v nervové tkáni. Zánět nejprve aktivuje mikroglie a astrocyty ke zvýšené produkci ROS. Součinnost zánětu a oxidačního stresu vede ke vzniku  $\beta$ -amyloidu. Přítomnost  $\beta$ -amyloidu v mozkové tkáni způsobuje vznik patologických jevů, jako jsou neurofibrilární klubka, zánětlivá reakce, přítomnost oxidačního stresu a mitochondriální dysfunkce, které jsou v konečném důsledku příčinou zániku neuronů a nástupu symptomů demence (Akbar a kol., 2016; García-Escudero, 2013; Wang, 2014).

ROS mohou stimulovat tvorbu enzymu  $\beta$ -sekretázy 1, který je přímo spojován se vznikem  $\beta$ -amyloidu. Vyšší množství  $\beta$ -amyloidu způsobí další zvýšení hladiny ROS/RNS a to vede k zesílení oxidačního stresu a k mitochondriálním dysfunkcím, které jsou zřejmě způsobeny již zmíněnými posttranslačními modifikacemi proteinů a poškozením mitochondriální DNA.

Navíc mitochondriální ROS mohou modifikovat tvorbu  $\beta$ -amyloidu a udržovat tak mitochondriální dysfunkci, což vede k dalšímu zvyšování hladiny ROS. Tento cyklus se může opakovat a tím dochází k dalšímu zvýšení ROS/RNS, jedná se vlastně o pozitivní zpětnou vazbu. Přítomnost oxidačního stresu aktivují MAPKs, které následně fosforylují protein tau. Hromadění tau proteinu dále prohlubuje nedostatečné fungování mitochondrií. Kombinace zvýšeného dělení se sníženou fúzí mitochondrií má za následek podporu interakcí  $\beta$ -amyloidu s proteinem Drp-1, který se účastní mitochondriálního dělení. Tím je způsobena fragmentace mitochondrií s poškozením axonálního transportu a synaptické poškození neuronů. Interakce Drp-1,  $\beta$ -amyloidu a fosforylovaného tau proteinu pravděpodobně způsobují nadměrnou fragmentaci mitochondrií, která přispívá k poškození neuronů a k poklesu kognitivních funkcí. Při post mortem analýze mozků pacientů AD byla zjištěna snížená aktivita GTPázy, která jinak zajišťuje mitochondriální fragmentaci. Přes všechna tato zjištění nejsou přesně známy molekulární mechanismy, které způsobují zvýšení tau proteinu a  $\beta$ -amyloidu odpovědné za mitochondriální dysfunkce a smrt neuronů. Lze však předpokládat, že posttranslační modifikace mitochondriálních proteinů hrají v tomto procesu významnou roli (García-Escudero, 2013; Pavlov, 2009; Wang, 2014; Yana, 2013).

ROS se pochopitelně netvoří pouze v průběhu oxidačního stresu, ale i za fyziologického stavu. Pomocí přirozených antioxidantů a enzymů jsou ROS většinou udržovány na relativně nízké hladině. Až poškození antioxidantních systémů vede k redoxní nerovnováze a nadprodukci ROS (García-Escudero, 2013; Pavlov, 2009; Wang, 2014; Yana, 2013).

Experimentálně bylo dále prokázáno, že s AD souvisí peroxidace lipidů. Lipidovou peroxidací se označuje proces, kdy vlivem nadprodukce ROS jsou poškozovány polynenasycené kyseliny lipidů za vzniku hydroperoxidů. U AD byly nejvíce studovány reaktivní aldehydy, do kterých jsou zahrnovány 4-hydroxynonal, malondialdehyd a 2-propenal a také isoprostanoidy. U AD je pozorována zvýšená oxidace proteinů, která je způsobena buď přímým působením ROS, nebo působením glykace, glykosylace nebo právě lipidové peroxidace. Nejvíce studovanými produkty oxidace proteinů jsou proteinové karbonyly a 3-nitrotyrosin (García-Escudero, 2013; Pavlov, 2009; Wang, 2014; Yana, 2013).

Mnoho studií poukazuje na fakt, že při AD je přítomno poškození DNA nebo RNA. Oxidační poškození DNA může způsobit zlomy v dvouřetězci DNA, zesílení DNA/DNA nebo DNA/proteinů a modifikaci bází. RNA je vystavena působení oxidačního poškození a modifikaci stejně jako DNA. U AD převažuje oxidace spíše u cytosolové RNA než u jaderné DNA. U AD také trvá delší dobu, než se projeví první příznaky a je možné diagnostikovat tuto nemoc. Studie Wanga (2014) poukazují na skutečnost, že vzniku vlastního onemocnění

předchází mírná kognitivní porucha (MCI, z angl. *Mild Cognitive Impairment*). Při MCI sice nejsou přítomny senilní plaky a neurofibrilní klubka, ale již lze zaznamenat přítomnost silné oxidační nerovnováhy. Dále bylo prokázáno, že s patogenezí AD souvisí snížené množství nebo nedostatek vitaminů s antioxidačním efektem. Například bylo prokázáno, že dlouhodobý deficit vitamínu E může způsobit demenci a může tak přispívat k vyššímu riziku vzniku AD. Nedostatek vitamínu B9 vedl k poklesu kognitivních funkcí a ke vzniku demence a deprese. U pacientů s deficitem vitamínu D a B12 se také objevovaly demence a poškození kognitivních funkcí. Tato zjištění potvrzují, že oxidační nerovnováha přispívá k rozvoji AD. Zvýšené sporadické mutace mtDNA jsou pozorovány u pacientů s AD. Díky absenci ochranných proteinů, jako jsou histony, je opravný systém nedostatečně účinný a v přítomnosti ROS dochází k poškození mtDNA (García-Escudero, 2013; Pavlov, 2009; Wang, 2014; Yana, 2013).

Správná funkce mitochondrií je zaručena jejich neporušenou strukturou, která udává správný elektrochemický gradient. Mitochondrie s porušenou strukturou, zničenými kristami a částečně nebo úplně ztraceným obsahem se hojně vyskytovaly v neuronech při biopsii mozku u AD. Výrazné změny v expresi proteinů účastnících se fúze a dělení mitochondrií souvisejí s rozvojem AD. Změny v expresi se vyskytovaly u proteinů DLP1, OPA1, Mfn-1 a 2 a Fis1. Mitochondriální DLP1, zodpovídající za dělení mitochondrií, je v mozcích pacientů s AD zvýšen. DLP1 reaguje s monomery a oligomery  $\beta$ -amyloidu a tímto dochází k fosforylaci tau proteinu. Neurony v mozcích pacientů s AD obsahovaly mitochondrie se zvýšenou schopností se dělit, což přispívalo k poškození struktury mitochondrií a u těchto mitochondrií došlo navíc k jejich nabobtnání. Nadměrné dělení je schopné vyvolat poškození mitochondrií a je tak příčinou destruktivních jevů patrných u AD. Zvýšená produkce ROS probíhá společně s rozpadem mitochondrií i v případě, když jsou neurony vystaveny vysoké koncentraci glukózy. Při zvýšené hladině glukózy sice dochází k inhibici mutantní formy DLP1 a tím je zastavena produkce ROS. Bohužel ani tímto mechanismem není možné ochránit mitochondrie před fragmentací. Tyto skutečnosti naznačují, že mitochondriální fragmentace se velkým dílem podílí na oxidační nerovnováze a na zvýšené produkci ROS. V současné době bylo poukázáno na skutečnost, že inhibitory mitochondriálního elektronového transportního řetězce, jako je například rotenon, mohou způsobit rozpad mitochondriální sítě a zvýšit tvorbu ROS. Antioxidanty mohou pouze částečně zmírnit účinek těchto inhibitorů. Zastavení mitochondriálního štěpení zastavuje nadprodukcí ROS a brání vzniku mitochondriálních a buněčných dysfunkcí. Lze tedy říci, že mitochondriální funkce a dynamika spolu blízce

souvisí a spolu se stavbou mitochondrií jsou důležitým aspektem pro udržení rovnováhy ROS (García-Escudero, 2013; Pavlov, 2009; Wang, 2014; Yana, 2013).

### 3.1.2 Alzheimerova nemoc a inzulinová signalizace

Nejnovější studie naznačují, že pokles glukózy v mozku při AD souvisí s poklesem exprese genů, které kódují podjednotky mitochondriálního elektronového transportního řetězce. Sleight a kol. (2011) ve své studii uvedl, že narušená signalizace inzulinu může vést k mitochondriálním dysfunkcím. Narušená produkce a signalizace inzulinu v mozku AD může sama o sobě vyvolat mozkovou mitochondriální dysfunkci v důsledku závažného poškození metabolismu glukózy nebo glykogenu. Současné poznatky naznačují, že mitochondrie jsou primární metabolickou základnou, která může selhávat v průběhu inzulinové rezistence. Bohužel přesná molekulární vazba mezi inzulinovou rezistencí a mitochondriální dysfunkcí v mozku AD není zatím jasně definována. Je však známo, že v mozku u AD jsou v mitochondriích ohroženy dva procesy. Jedná se o Krebsův cyklus a oxidační fosforylaci. Abnormální funkce Krebsova cyklu a/nebo oxidační fosforylace způsobují nejen snížený metabolismus glukózy, ale také zvýšenou tvorbu ROS, oxidační poškození a apoptózu. Bylo prokázáno, že k tomuto jevu dochází před vlastním vznikem senilních plaků a před klinickým nástupem projevů onemocnění (Abolhassani a kol., 2015; Wang, 2014).

Díky moderním detekčním postupům je možné detekovat oxidované báze DNA, které jsou způsobené oxidačním stresem. Existence oxidovaných bází DNA poškozených neuronů byla potvrzena v jaderné nebo mitochondriální DNA *post mortem* vyšetřením. 8-oxoG představuje jeden z hlavních produktů oxidačního poškození DNA a zároveň jednu z překážek případné opravy. Jeho akumulace v jaderné i mitochondriální DNA je pokládána za významný marker AD (Abolhassani a kol., 2015).

Imunohistochemické *post mortem* vyšetření mozku postiženého AD odhalilo přítomnost cytosolové akumulace 8-oxoG v hipokampálních pyramidálních neuronech a v neuronech kůry temporálního laloku paralelně s depozity  $\beta$ -amyloidu. Tato akumulace časově předchází klinickým symptomům vlastního onemocnění. Nárůst 8-oxoG v DNA je způsoben buď přímou oxidací guaninu v DNA, nebo prostřednictvím inkorporace 8-oxoG z nukleotidových poolů, ve kterých se v přítomnosti oxidačního stresu vytvoří 8-oxo-2deoxyguanosin trifosfát (8-oxodGTP). 8-oxo-dGTP může být využit DNA polymerázou jako prekurzor pro syntézu DNA a tudíž 8-oxoG je začleněn do vznikajícího templátového vlákna naproti adeninu a cytosinu. Tři enzymy, a to MTH1, OGG1 a MUTYH působí proti



zabudování 8-oxoG do lidské DNA. MTH1 také známý jako NUD1 účinně hydrolyzuje 8-oxoG v nukleotidech, čímž zabrání jeho zabudování do řetězce DNA. OGG1 s 8-oxoG glykosylasovou aktivitou odstraňuje 8-oxoG v opozici naproti cytosinu a tím zabrání akumulaci 8-oxoG v DNA. Adenin vložený proti 8-oxoG v templátovém vlákne DNA je vyštěpen enzymem MUTYH a to pomocí adeninové DNA glykosylázy. Tyto tři zmíněné enzymy fungují v jádrech i mitochondriích a chrání neurony před ukládáním 8-oxoG. (Abolhassani a kol., 2015; García-Escudero, 2013).

Oka a kol. (2008) ve své práci demonstruje, že ukládání 8-oxoG v jaderné a mitochondriální DNA spouští dvě na sobě vzájemně nezávislé cesty buněčné smrti. Jakmile se 8-oxoG nahromadí ve zvýšené míře v jaderné DNA, PARP-1 se váže na SSB tvořenou MUTYH vyvolávající opravu bazí. Zvýšení polymeru PARP-1 vedek vyčerpání  $\text{NAD}^+$  a ATP a k následné nukleární translokaci apoptózu vyvolávajícího faktoru (AIF). AIF poté indukuje apoptickou smrt buněk. Tudíž 8-oxoG, který se hromadí ve vysoké hladině v mitochondriální DNA, degraduje tuto mitochondriální DNA prostřednictvím enzymu MUTYH, což vede k mitochondriální dysfunkci a aktivaci kalpainů, které způsobují lyzozomální prasknutí a buněčnou smrt. Při oxidačním stresu se 8-oxoG vysoce akumuluje v mitochondriální DNA, ale nikoliv v jaderné DNA nervových buněk. Naopak v případě mikrogliaální proliferace, při zánětlivých reakcích se zvýšenou produkcí ROS, se 8-oxoG akumuluje v jaderné DNA. Podávání kalpainu nebo inhibitoru PARP významně zlepšilo 3-NP-indukovanou striatální degeneraci a snížilo mikrogliózu u myši s deficiencí MTH1/OGG. Lze tedy říci, že na kalpainu závislé poškození neuronů způsobuje mikrogliózu, která zesiluje neurodegenerativní procesy. Aktivace kalpainu a PARP je charakteristickým znakem neurodegenerace jak u zvířecích modelů, tak v lidském mozku postiženém AD. Kalpain a PARP jsou proto považovány za slibné terapeutické cíle pro různá neurodegenerativní onemocnění (Abolhassani a kol., 2015; García-Escudero, 2013).

Výše zmíněný kalpain se řadí do skupiny na vápníku závislých proteolytických enzymů. Aktivace cysteinových proteázových kalpainů je výsledkem porušené homeostázy vápníku při neurodegenerativním procesu. Kalpain je znám jako jeden z nejvýznamnějších proteinů zasahujících do apoptózy neuronů. Jedná se o heterodimerní protein skládající se z malé a velké podjednotky a ve své neaktivní formě je lokalizován v cytosolu. Při zvýšení hladiny vápníku dochází k translokaci kalpainu na membránu, kde je aktivován vápníkem a fosfolipidy. Aktivita kalpainu je přísně regulována vápenatými ionty, ale i přes to existuje endogenní inhibitor kalpainu, který se nazývá kalpastatin. Kalpastatin se reverzibilně váže na

aktivní místo kalpainu a dochází k jeho inhibici, děje se tak pouze v přítomnosti vápenatých iontů (Yildiz-Unal a kol., 2015)

Jednou z potenciálních terapeutických inovací je odhalit možnosti prevence apoptických pochodů zprostředkovaných právě kalpainem. Nejčastěji se používají inhibitory kalpainu, ale jsou známy i jiné postupy, jako je například zvýšená exprese nebo inhibice proteinů, které se zapojují do buněčné signalizace (např. glutamátový receptor), dále jsou využívány hormony a kompetitivní peptidy inhibující enzymatickou aktivitu kalpainu (Yildiz-Unal a kol., 2015).

## 3.2 Parkinsonova nemoc (PD)

Při tomto onemocnění dochází k zániku dopaminergních neuronů v *substantia nigra*. Nejhoršími příznaky narušujícími běžnou denní činnost, jsou třes, poruchy hybnosti a řeči. Typické pro tuto nemoc jsou abnormální agregáty  $\alpha$ -synukleinu a změněná hladina parkinu (E3 ubikvitin ligázy). Hlavním znakem PD jsou Lewyho tělíska a Lewyho neurity. Lewyho tělíska jsou ložiska vláknitých proteinů v cytosolu neuronů. Pomocí histologického vyšetření, které je zaměřeno na tvorbu Lewyho neuritů nebo Lewyho tělísek, je možné určit stadium onemocnění. V *substantia nigra*, mozkové kůře, hipokampu a v mozečku se tvoří intracelulární inkluze obsahující zmíněný alfa-synuklein. Ukazuje se, že hromadění alfa-synukleinu může být vyvoláno prostřednictvím specifických mechanismů probíhajících v mitochondriích. Podle Akbara a kol. (2016) je hromadění alfa-synukleinu způsobeno interakcí mezi alfa-synukleinem a mitochondriální cytochrom c oxidázou, což vede k mitochondriální dysfunkci a v konečném důsledku k degeneraci nervové soustavy. Navíc může být alfa-synuklein modifikován nitrací a/nebo oxidací, což podporuje jeho akumulaci a stav označovaný jako synukleinopatie. Snížení hladiny přirozeného antioxidantu glutathionu (GSH) a zvýšení hladiny oxidovaných molekul proteinů, lipidů a DNA může podpořit progresi PN. Bohužel dosud není známo, které proteiny jsou oxidovány a jak tyto změněné proteiny navozují mitochondriální dysfunkci a smrt neuronů (Akbar a kol., 2016; Bhat a kol., 2015; Grünewald a kol., 2016).

### 3.2.1 Parkinsonova nemoc a oxidační stres

Oxidační stres vzniklý působením ROS může být příčinou zániku dopaminergních neuronů. Za jeden z primárních zdrojů ROS je pokládán mitochondriální komplex I (neboli NADH-ubichinonoxidoreduktáza) (Akbar a kol., Subramaniam a Chesselet, 2013).

Do komplexu I jsou transportovány elektrony z mitochondriální matrix do elektronového transportního řetězce pomocí elektronového přenašeče NADH. NADH přenáší elektrony na koenzym Q (CoQ, ubichinon), který tím redukuje na ubichinol. Komplex I obsahuje flavinmononukleotid (FMN) a dále Fe-S klastry, které se podílejí na přenosu elektronů z NADH na CoQ (Subramaniam a Chesselet, 2013).

Je dlouho známo, že u pacientů s idiopatickou PD byla při *post mortem* vyšetření zjištěna v *substantia nigra* snížená aktivita komplexu. Nedostatečnost mitochondriálního komplexu I byla dále detekována ve frontální kůře, mírné poškození se nacházelo ve striatu, kůře mozkové, fibroblastech, krevních destičkách, dále pak ve svalech a lymfocytech. Podjednotky komplexu I obsahují oxidované proteiny a u pacientů s PD byla zjištěna spojitost mezi

zvýšenou oxidací proteinů a sníženou kapacitou elektronového přenašeče a tato souvislost naznačuje, že oxidační poškození těchto podjednotek může způsobit poškození komplexu I. Díky nejnovějším studiím lze tvrdit, že poškození mitochondriálního dýchacího řetězce, zvláště pak v komplexu I a následné zvýšení tvorby ROS přímo i nepřímo přispívají k rozvoji sporadické formy PD (Akbar a kol., 2016; Bhat a kol., 2015; Subramaniam a Chesselet, 2013).

Během života jsou dopaminové neurony vystaveny působení ROS a RNS. Dopamin je nestálá molekula patřící mezi katecholaminy a v *substantia nigra* podléhá autooxidaci ať již vlivem ROS či při procesu stárnutí. Dopamin je degradován monoaminoxidázou B (MAO-B) na konečný produkt homovanilovou kyselinu. Problém může nastat v závislosti na věku, kdy s jeho postupem se aktivita MAO-B zvyšuje, což může vést ke snížení dostupnosti katecholaminů v synaptické štěrbině. Rovněž oxidativní deaminace MAO vede ke vzniku amoniaku a peroxidu vodíku, které mohou samy o sobě působit cytotoxickým efektem. Během fyziologického stárnutí klesá hladina dopaminu o 50-60%, při klinické manifestaci PD činí tento pokles 80-90 % v *substantia nigra* a 40-50 % ve ventrálním tegmentu. U dědičné formy, která může být způsobena mutací několika genů, dochází k degeneraci neuronů v *substantia nigra*. Oxidační stres je hlavní příčinou vzniku obou forem PD. U pacientů se nachází zvýšené množství oxidovaných lipidů, proteinů a DNA a také snížená hladina GSH. ROS mohou působit na enzymy, například na tyrosinovou MAO a hydroxylázu. Vyšší citlivost dopaminergních neuronů *substantia nigra* je vysvětlována přítomností železa a proto i přítomností Fentonovy reakce, kdy superoxidový a hydroxylový radikál mohou přispět k dalšímu rozvoji oxidačního stresu (Akbar a kol., 2016; Bhat a kol., 2015; Subramaniam a Chesselet, 2013).

Poškození dopaminergních neuronů pravděpodobně vzniká následkem mutací v genech mitochondriálních proteinů DJ-1, Parkin, PINK, které se vždy vyskytují u dědičné formy PD. V buňkách pacientů s mutací v genu parkin byla detekována snížená aktivita komplexu I. Mutace v genu PINK 1 způsobovala mitochondriální dysfunkci s nadměrnou produkcí volných radikálů, také při porušení správné funkce proteinu DJ-1 dochází k hromadění ROS (Akbar a kol., 2016; Bhat a kol., 2015; Subramaniam a Chesselet, 2013).

Enzym aldehyddehydrogenáza (ALDH) má za úkol odstranit aldehydy a lipidové peroxidy z mozkové tkáně a z dalších tkání. U pacientů s PN byla zjištěna snížená exprese ALDH 1. Navíc v poškozeném komplexu I je snížena dostupnost  $\text{NAD}^+$ , který je důležitý pro činnost izoform ALDH odstraňujících reaktivní aldehydy. Snížená funkce ALDH izoenzymů může být způsobena vlivem toxinů z vnějšího prostředí a/nebo sníženou expresí ALDH, která je

úzce spjata s patofyziologií PD (Akbar a kol., 2016; Bhat a kol., 2015; Subramaniam a Chesselet, 2013).

### 3.2.2 Parkinsonova nemoc a mikroglie

U PD lze zaznamenat příznaky chronického zánětu nervové tkáně za účasti mikroglie, tedy buněk odpovídajících za vrozenou imunitu v centrálním nervovém systému. Mikroglie je aktivována řadou faktorů včetně působení toxických látek. Její funkcí je odstraňování poškozených buněk a likvidace cizích patogenů. Při aktivaci mikroglie dochází k uvolnění volných radikálů (např. NO, superoxidu) a to vede k oxidačnímu stresu. Dlouhodobá aktivace nebo vystupňovaná aktivace mikroglie způsobují nadměrnou a nekontrolovatelnou zánětlivou odpověď v nervové tkáni a to může vést k opakovanému sebepoškozujícímu se cyklu a z něj vznikající neurodegeneraci. Z poškozených dopaminergních neuronů jsou uvolňovány molekuly neuromelaninu, alfa-synukleinu a aktivovaná forma MMP-3 (matrixová metaloproteináza 3). Neuromelanin je nerozpustný polymer a v *substantia nigra* způsobuje tmavou pigmentaci. Vzhledem k jeho dlouhé přítomnosti v extracelulárním prostoru může být dalším z činitelů spoluzpůsobujících chronický zánět nervové tkáně. Především je to však alfa-synuklein, který navozuje aktivaci mikroglie s následnou dopaminergní neurodegenerací. Neurony stimulované alfa-synukleinem navíc stimulují astrocyty k produkci prozánětlivých cytokinů dále posilujících aktivaci mikroglie k chemotaxi a proliferaci. Při oxidačním stresu dochází ke zvýšení MMP-3 všeobecně usnadňujícím produkci ROS a RNS. MMP-3 se také podílí na tvorbě IL-1 $\beta$  a na expresi dalších prozánětlivých cytokinů. Bylo prokázáno, že MMP-3 způsobuje poškození hematoencefalické bariéry a napomáhá tak průchodu neutrofilů, což přispívá k udržování zánětlivé reakce (Bhat a kol., 2015).

### 3.2.3 Parkinsonova nemoc a mitochondriální DNA

MtDNA je náchylná k mutacím zřejmě díky méně výkonným opravným mechanismům a nedostatku chránících histonů. Snížená aktivita komplexu I vede ke zvýšení produkce ROS, které mohou působit na mtDNA, která kóduje 7 ze 45 podjednotek komplexu I. Změněný metabolismus v buňkách s mtDNA pacientů s PD narušuje mikrotubulární síť a usnadňuje cestu vzniku autolyzozomů. Ačkoliv při srovnání mtDNA zdravých jedinců a mtDNA pacientů s PD nebyly nalezeny žádné charakteristické mutace s přímým vztahem k onemocnění, bylo pozorováno v dopaminergních neuronech *substantia nigra* na věku závislé zvýšení delecí v mtDNA související s dysfunkcí respiračního řetězce. Tyto nálezy naznačují, že jakékoliv změny ve skladbě mtDNA mohou přímo ovlivnit aktivitu a funkci

mitochondriálního dýchacího řetězce. Navíc delece mtDNA byly mírně zvýšené v *substantia nigra* u PD pacientů v porovnání s kontrolní skupinou. Nicméně tyto delece nebyly pozorovány u jiných neuronů (pyramidální neurony v kůře mozkové, neurony v hipokampu a Purkyňovy buňky mozečku). Delece mtDNA jsou zřejmě specifické pro neurony v *substantia nigra*, které jsou více citlivé na oxidační stres a to vede k jejich ztrátě u PD (Coskun a kol., 2013; Subramaniam a Chesselet, 2013).

### 3.2.4 Geny asociované s monogenní Parkinsonovou nemocí

#### 3.2.4.1 PARK 1/4 –SNCA

V roce 1996 byl objeven první lokus PN a to PARK1. V tomto lokusu byla u rodiny s autozomálně dominantní PN nalezena bodová mutace A53T v genu *SNCA*, který kóduje presynaptický protein alfa-synuklein. Později byly objeveny mutace A30P a E46K. S autozomálně dominantní formou PD bývají spojovány tři mutace (A530T, A30P a E46K) a duplikace a triplikace genu kódující alfa-synuklein (PARK 1, *SNCA*) (Fiala a Růžička, 2009; Subramaniam a Chesselet, 2013).

Onemocnění se projevuje spíše ve formě „*late-onset*“ (pozdního nástupu), ale může se rozvinout už kolem 40. - 50. roku života, v tomto případě má rychlejší progresi a často se vyskytuje i demence. Fenotyp mutace E46K se podobá spíše demenci s Lewyho tělísky. Jsou známy i duplikace i triplikace celého genu, které se označují PARK4. U nemocných s triplikací dochází k onemocnění s časným začátkem a rychlejší progresí s těžšími projevy než u pacientů s duplikací, jejichž fenotyp se podobá *late-onset* formě. U pacientů se sporadickou formou PD byly objeveny též polymorfismy *SNCA*, které bývají spojovány s vyšším rizikem vzniku PD. Polymorfismy se vyskytují docela často, i když mutace se vyskytují vzácně (Fiala a Růžička, 2009).

Alfa-synuklein je sám o sobě náchylný k fibrilární agregaci. Jeho agregáty se nacházejí v Lewyho tělískách a můžeme je spatřit i u dalších neurodegenerativních onemocnění, které se souhrnně nazývají synukleinopatie (např. multisystémová atrofie, demence s Lewyho tělísky aj., viz. kapitola 1.2.4 ). Přesná fyziologická funkce alfa-synukleinu není zatím zcela známa, existují však důkazy o jeho vlivu na funkci vezikul, synaptickou plasticitu a metabolismus dopaminu. Konformace alfa-synukleinu je závislá na vnějších vlivech, v monomerním stavu dokáže vytvořit různé sekundární struktury a je schopen polymerizovat. Polymerizace vede od dimerů k morfologicky se lišícím oligomerům a protofibrilám až k tvorbě nerozpustných agregátů. Agregaci spouští zvýšená koncentrace alfa-synukleinu a změna pH. Také

přítomnost některých kovů a některá organická rozpouštědla a látky podobné herbicidům byly schopné vyvolat tvorbu inkluzí. Mutace mohou přispět k snadnější tvorbě fibril. Významným faktorem může být defekt odbourávání alfa-synukleinu v ubikvitin-proteazomovém komplexu a lysozomech. Alfa-synukleín neurotoxicky poškozuje mozkovou tkáň jednak prostřednictvím mechanického poškození buněčných kompartmentů, ale i pouhou ztrátou fyziologických funkcí, případně získáním nových toxických vlastností. Podle recentních studií způsobují toxicitu alfa-synukleinu spíše rozpustné oligomery (protofibrily), nikoliv nerozpustné agregáty a maturované fibrily. Z toho vyplývá, že formování agregátů by mohlo mít jistý neuroprotektivní efekt a proto by Lewyho tělíska vznikala kvůli eliminaci toxických oligomerů a tím pádem nejsou vyvolávající příčinou, ale až důsledkem neurotoxicity. Toxická aktivita alfa-synukleinu byla zjištěna i v extracelulárním prostoru, kde jeho agregáty byly schopny spustit mikrobiální aktivaci (Coskun a kol., 2013; Fiala a Růžička, 2009).

Interakce alfa-synukleinu s mitochondriemi spouští uvolnění cytochromu c, zvyšuje hladinu vápníku a NO a vede k oxidační modifikaci mitochondrií. V mitochondriích se alfa-synukleín spojuje s vnitřní membránou. Zvýšená exprese A53T alfa-synukleinu urychluje snížení funkce mitochondriálního komplexu I a nadprodukcii ROS. Okyselení cytosolu způsobuje zvýšenou translokaci alfa-synukleinu do membrány mitochondrií. Tato translokace probíhá rychleji za nízkého pH při oxidačním nebo metabolickém stresu a tyto souvislosti naznačují, že alfa-synukleín se významně podílí na funkci mitochondrií zvláště za patologických podmínek. (Subramaniam a Chesselet, 2013).

#### **3.2.4.2 PARK2- parkin**

V současné době je identifikováno více než 100 mutací parkinu, jedná se o bodové mutace a exonové delece a duplikace. Tyto mutace jsou spojovány s autozomálně recesivní formou PN a s „*early-onset*“ fenotypem (Fiala a Růžička, 2009).

Parkin (PARK2) se podílí na odbourávání proteinů prostřednictvím ubikvitin-proteazomového systému. Parkin má aktivitu E3 ubikvitin ligázy, enzymu připojujícího ubikvitin k bílkovinám, které mají být následně degradovány v proteazomu. Ztráta E3 ubikvitin ligázové aktivity vede k hromadění toxických proteinových agregátů a tato akumulace vede k autozomálně recesivní PN v mladém věku. Pomocí *in vitro* i *in vivo* experimentů byla prokázána anti-apoptická aktivita parkinu. Parkin může inhibovat apoptózu pomocí ubikvitinace svého substrátu Pael-R (*Parkin-associated endothelial- receptor like receptor*), který je schopen indukovat buněčnou smrt. Parkin také zvyšuje aktivitu

transkripčního faktoru NK- $\kappa$ B (nukleární faktor kappa B), který indukuje anti-apoptické geny a reguluje metabolismus mtDNA. Buněčná poškození mohou být způsobena nedostatečnou degradací substrátů parkinu. Agregovaný parkin se podílí na poškození buněčného cytoskeletu, poškozují funkci ubikvitin-proteazomového systému a přispívá k zániku dopaminergních neuronů (Akbar a kol., 2016; Fiala a Růžička, 2009; Subramaniam a Chesselet, 2013).

### 3.2.4.3 PARK 3

Lokus PARK 3 bývá spojován s autozomálně dominantní formou PD a s „*late-onset*“ fenotypem. V současnosti je věnována pozornost genu kódujícímu sepiapterin reduktázu (SPR), tento protein katalyzuje biosyntézu tetrahydrobiopterinu (BH4). BH4 je důležitým kofaktorem hydroláz aromatických kyselin, mezi ně patří i enzym tyrosin hydroxyláza, který je nezbytný pro syntézu dopaminu. U pacientů s PD byla v mozkové tkáni detekována zvýšená exprese SPR oproti kontrolnímu souboru zdravých pacientů (Fiala a Růžička, 2009).

### 3.2.4.4 PARK 5 – UCH-L1

Neuron-specifický enzym UCH-L1 (*Ubiquitin carboxy-terminal hydrolase-L1*) se nachází v bílkovinách mozkové tkáně v 1-2% podílu a byl zjištěn i v Lewyho těliscích. Tento enzym se podílí na degradaci bílkovin pomocí ubikvitin-proteazomového systému. Díky své konformaci vykazuje dvojí enzymatickou aktivitu. V monomerním stavu hydrolyzuje polyubikvitinové řetězce a přispívá tak k recyklaci ubikvitinu. Dimer má aktivitu ubikvitin ligázy a dochází k rychlejšímu navázání volného ubikvitinu na cílové proteiny. Monomerní forma přispívá k degradaci alfa-synukleinu v proteazomu a dimer váže ubikvitin na alfa-synuklein a dochází tak k jeho agregaci. Mutace I93M v genu kódující UCH-L1 byla detekována u sourozenců s autozomálně dominantní PD a podobala se sporadické *late-onset* formě a dále byla objevena i genetická varianta S18Y, která je spojována s nižším rizikem PD (Fiala a Růžička, 2009).

### 3.2.4.5 PARK 6 – PINK 1

Lokus PARK 6 byl poprvé popsán u rodiny s autozomálně dominantní PD a později byla nalezena mutace G309D genu kódující PINK 1 (*PTEN-induced kinase 1*). Fenotyp se podobá *early-onset* formě PD, ale jsou známy i kazuistiky s *late-onset* fenotypem. PINK 1 je kináza s anti-apoptickým efektem vyskytující se v mitochondriích a také v Lewyho těliscích. PINK 1 snižuje uvolňování cytochromu c a aktivaci kaspázy 3. PINK 1 a parkin mezi sebou interagují a oba jsou zřejmě obsaženy v jedné anti-apoptické kaskádě a podílejí se na funkci a



morfologii mitochondrií. Předpokládá se, že mutace parkinu a PINK 1 kinázy, kdy výsledkem mutace je změněná PTEN-indukovaná kináza, se podílejí na kontrole funkčnosti mitochondrií a mohou způsobit rozvoj autozomálně recesivní PN. PINK 1 kináza je syntetizována v různých částech mozku, včetně hipokampu, *substantia nigra* a Purkyňových buněk mozečku. PINK 1 se zapojuje do metabolismu mitochondrií, oxidačního stresu a degradace bílkovin pomocí ubikvitinu (Akbar a kol., 2016; Coskun a kol., 2013; Fiala a Růžička, 2009).

#### **3.2.4.6 PARK 7 – DJ-1**

Tento lokus byl popsán u rodiny s autozomálně recesivní dědičnou formou PD a s *early-onset* fenotypem a byla zde objevena bodová mutace L166P genu DJ-1. DJ-1 byl poprvé identifikován jako onkogen a tento protein má antioxidační aktivitu, jehož expresi indukují ROS. Snížení ROS pomocí DJ-1 probíhá pomocí autooxidace DJ-1 nebo pomocí stabilizace regulačních faktorů transkripce antioxidantů Nrf2 (*Nuclear factor erythroid 2-related factor*). DJ-1 pomáhá zvyšovat koncentraci GSH v buňkách a má také vlastní anti-apoptické vlastnosti. Mutace snižují jeho stabilitu a tím dochází k porušení jeho funkce. Mutace L166P mění jeho strukturu, což má za následek zvýšenou degradaci v ubikvitin-proteazomovém systému (Coskun a kol.; 2013, Fiala a Růžička, 2009).

#### **3.2.4.7 PARK 8- LRRK 2**

Lokus PARK 8 byl poprvé popsán u autozomálně dědičné formy s late-onset PN. Později byla objevena mutace genu kódující protein dardarin, který je dnes označován jako LRRK 2 (*Leucine rich repeat kinase 2*). Fenotyp obvykle odpovídá late-onset sporadické formě PN, ale může mít i časný začátek. LRRK 2 má kinázovou i GTPázovou aktivitu a ovlivňuje endocytózu a dynamiku vezikul, je schopen vázat  $\alpha$ - a  $\beta$ -tubulin. Mutace indukují oxidační stres a apoptózu a LRRK 2 může tvořit komplexy s proteinem tepelného šoku Hsp 90 (*Heat shock protein 90*) a tím dochází ke stabilizaci a toxicitě (Coskun a kol., 2013; Fiala a Růžička, 2009).

Zvýšená exprese mutovaných proteinů LRRK 2 vedla k apoptické smrti neuronů a mutace LRRK 2 způsobují mitochondriální dysfunkce (Subramaniam a Chesselet, 2013).

### 3.3 Huntingtonova nemoc (HD)

HD je dědičné, fatální neurodegenerativní onemocnění, které je způsobeno prodloužením trinukleotidových repetitivních CAG, které kódují protein huntingtin (Martin a kol., 2012; Wang a kol., 2013).

Během HD dochází k postupnému odumírání energeticky náročných neuronů v *corpus striatum*. Jedna z teorií o vzniku HD hovoří o tom, že mHtt (*mutant huntingtin protein*; mutantní huntingtin) naruší správnou funkci mitochondrií a tím dojde ke snížení dodávky energie pro tyto neurony, které poté umírají. Poškození mitochondrií může způsobit mHtt pomocí blokace exprese genu PGC1 $\alpha$ , který působí jako transkripční koaktivátor jaderných receptorů a dalších transkripčních faktorů. Tento gen se účastní regulace řady metabolických procesů i biogeneze mitochondrií a oxidační fosforylace. V neuronech *corpus striatum* je mHtt schopen vyvolat inhibici transkripce PGC1 $\alpha$ . Tato inhibice je zřejmě způsobena narušením vazby (CREB/TAF4) do promotoru PGC1 $\alpha$  a tím je způsobena inhibice exprese a narušení neuronálního metabolismu. CREB/TAF4 je protein vázající se na cAMP-responzivní element/faktor 4 asociovaný s TATA vazebným proteinem (Marková a Hansíková, 2016; Raymond a kol., 2011).

#### 3.3.1 Huntingtonova nemoc a vápenaté ionty

V neuronálních mitochondriích způsobuje mHtt narušení regulace Ca<sup>++</sup>. Mitochondrie jsou schopny akumulovat nebo uvolnit Ca<sup>++</sup> do cytosolu v závislosti na energetických nárocích. Tento transport Ca<sup>++</sup> je uskutečňován pomocí protonového gradientu. Správné hospodaření mitochondrií s Ca<sup>++</sup> je proto zásadní pro přežití neuronů. Pokud je tato rovnováha narušena dochází k „vybití“ mitochondriálního membránového potenciálu, otevření mitochondriálního permeabilního tranzitního póru (MPTP), uvolnění cytochromu c a k aktivaci kaskády buněčné smrti. Mutovaný i normální Htt jsou schopny se vázat na vnější mitochondriální membránu, ale pouze mHtt je schopen zvýšit senzitivitu MPTP k otevření póru pro výstup Ca<sup>++</sup> a tím spustit apoptické procesy (Marková a Hansíková, 2016; Wang a kol., 2013).

#### 3.3.2 Huntingtonova nemoc a oxidační stres

Zvýšený oxidační stres je schopen způsobit změny v množstvích a aktivitách různých enzymů a molekul. U pacientů s HD bylo pozorováno v *nucleus caudatus*, *putamen* a mozkové kůře výrazné snížení aktivity enzymu akonitázy, která se nachází v Krebsově cyklu. Snížená aktivita akonitázy zřejmě souvisí se zvýšením ROS, neboť aktivita tohoto enzymu je

závislá na změně jejich množství. Na zvýšení ROS u pacientů s HD může upozornit akumulace lipofuscinu, který vzniká jako produkt peroxidace nenasycených mastných kyselin. Se zvyšující se hladinou ROS se zvyšuje jeho akumulace a tento efekt byl pozorován v neuronech a neurogliích pacientů s HD. V mozkové tkáni pacientů byly pozorovány zvýšené hladiny mitochondriální superoxid dismutázy a katalázy, neboť při zvyšujícím se oxidačním stresu stoupá i aktivita antioxidačních obranných mechanismů (Marková a Hansíková, 2016; Wang a kol., 2013).

Mnoho studií se zabývá tím, zda porušené enzymy komplexů oxidační fosforylace (OXPHOS) přispívají ke vzniku onemocnění, neboť změny v buněčné respiraci byly u pacientů s HD mnohokrát popsány. V *nucleus caudatus* a *putamen* byla detekována výrazně snížená aktivita komplexu II a III OXPHOS a mírně snížená aktivita komplexu IV. Otevřenou otázkou prozatím zůstává, zda jsou tyto změny způsobeny přímou asociací mHtt s komplexy OXPHOS nebo jsou zapříčiněny sekundárním nárůstem oxidačního stresu, narušeným transportem cytosolových proteinů do mitochondrií nebo jinými – dosud neznámými - faktory (Marková a Hansíková, 2016; Wang a kol., 2013).

### **3.3.3 Huntingtonova nemoc a dynamika mitochondrií**

S HD souvisí narušená dynamika a transport mitochondrií. Mitochondrie jsou schopny měnit svůj tvar a strukturu pomocí dvou protichůdných procesů fúze a dělení. Těchto dvou dějů se účastní řada proteinů a právě narušená funkce některých z nich byla pozorována u pacientů s HD. Dělení a fúze mitochondrií regulují GTPázy, které patří do rodiny proteinů příbuzných dynaminu. Fúzi regulují protein Opa1 a proteiny Mfn-1 a Mfn-2. Za dělení mitochondrií zodpovídá cytosolový protein Drp1 a Fis1 (protein dělení 1), který se nachází ve vnější mitochondriální membráně. Mutovaný Htt stimuluje protein Drp1 a společně způsobují fragmentaci mitochondrií v neuronech a fibroblastech. Dále byla pozorována snížená aktivita proteinů působících na mitochondriální fúzi a zvýšená tvorba proteinů vyvolávajících mitochondriální dělení. Mutovaný Htt je dále schopen narušit transport mitochondrií a dalších organel podél mikrotubulů v neuronech. Přesný mechanismus působení mHtt na pohyb mitochondrií zatím není zcela znám, ale předpokládá se, že mHtt interaguje s proteinem Hap1 a dalšími proteiny, které inhibují kinetiny a dyneiny zodpovědné za transport mitochondrií v neuronech. Další teorie říká, že agregáty mHtt zabraňují pohybu mitochondrií podél tubulů. Všechny tyto změny vedou v každém případě k nerovnoměrnému přísunu energie pro metabolické procesy v buňkách (Marková a Hansíková, 2016; Wang a kol., 2013).

### 3.4 Friedreichova ataxie

Friedreichova ataxie je nejčastější dědičnou ataxií, u které dochází ke snížení hladiny mitochondriálního proteinu frataxinu. Frataxin – protein o velikosti 23 kDA - je uložen v mitochondriální matrix, kde je spojen s vnitřní mitochondriální membránou (Federico a kol., 2012; Martelli a Puccio, 2014).

Nedostatek frataxinu souvisí s poruchou metabolismu železa, která vede k hromadění železa v mitochondriích a jeho vyčerpání v cytosolu. Podle nejnovějších hypotéz se frataxin podílí na interakcích s mitochondriální akonitázou, ferrochelatazou a mitochondriálními bílkovinami. Při porušeném metabolismu frataxinu byla pozorována modifikace exprese proteinů příbuzných železu, jako je transferinový receptor 1 (TFR1), feritin (FRT) a ferroportin (FPN) a následně dochází ke změněnému metabolismu železa (Martelli a Puccio, 2014).

Při experimentálních studiích na kvasinkách, v nichž byla snížena funkce frataxinu, docházelo k akumulaci železa v mitochondriích, vyčerpání železa z cytosolu a ke zvýšení odpovědi na vysokoafinitní absorpční systém železa, který je kontrolován cytosolickým senzorem železa a transkripčním faktorem YFH1 (*Yeast Frataxin Homolog 1*, kvasinkový homolog frataxinu). Při obnovení funkce frataxinu se železo distribuovalo z mitochondrií zpět do cytosolu (Bürk, 2017).

Funkcí frataxinu je aktivace proteinu ISC (z angl. *Iron-sulfur cluster*), který tvoří shluky železa a síry v buňce. Buňky s deficitem frataxinu mají vyčerpány ISC proteiny ze všech kompartmentů, největší deficit postihuje komplexy I, II a III v dýchacím řetězci a dále dochází ke snížení aktivity akonitázy. Jsou důkazy o tom, že frataxin interaguje s podjednotkami komplexu II a toto by potvrzovalo předpoklad o významné úloze frataxinu ve funkci dýchacího řetězce. Dále se předpokládá, že frataxin má důležitou roli v syntéze proteinů obsahujících hem a tyto proteiny se pak účastní řady důležitých procesů, jako je metabolismus kyslíku a přenos elektronů (Bürk, 2017).

Akumulace železa vyvolává prostřednictvím Fentonovy reakce zvýšenou tvorbu toxických ROS. Poškozená funkce dýchacího řetězce vede k dalšímu zvýšení oxidačního stresu a tím dochází k úniku elektronů a vzniku superoxidu a výsledkem je apoptická smrt buněk (Federico a kol., 2012; Martelli a Puccio, 2014).

### 3.5 Amyotrofická laterální skleróza

Amyotrofická laterální skleróza (ALS) je onemocnění, při kterém dochází k progresivní neurodegeneraci motoneuronů předních rohů míšních, motorického kortexu, motoneuronů hlavových nervů a degeneraci přímé kortikospinální dráhy. Na základě nejnovějších poznatků bylo zjištěno, že hlavní příčinou zániku motorických neuronů je mitochondriální dysfunkce. Při ALS dochází k fragmentaci mitochondrií a ke změnám v dělení a fúzi mitochondriálních proteinů. Tyto změny ovlivňují morfologii mitochondrií. V experimentech na zvířecích modelech s ALS, ale i na lidských pacientech byl pozorován poškozený mitochondriální transport, který může být zodpovědný za akumulaci abnormálních mitochondrií v axonech motorických neuronů. Studie na modelech buněčných kultur a u transgenních zvířat prokázaly aberace v oxidativním metabolismu, které souvisely se změnami v aktivitě elektronového transportního řetězce a s narušenou produkcí ATP. Mitochondrie u pacientů s ALS mají zhoršenou homeostázu  $Ca^{++}$  a zvýšenou produkci ROS, která je spojena s oxidačním poškozením (Federico a kol, 2012; Mwyderman a Chen, 2014).

Přibližně v 20 % se u dědičné formy ALS nachází mutace genu SOD1, který kóduje superoxidodismutázu 1, která obsahuje měď a zinek. Při post mortem vyšetření biopsických vzorků ALS pacientů byla objevena poškozená aktivita mitochondriálního dýchacího řetězce. Agregáty SOD1 na vnější mitochondriální membráně mohou zabránit přenosu proteinů a zvýšit produkci ROS, které následně poškozují mitochondriální lipidy a proteiny prostřednictvím oxidačního stresu. Tyto agregáty mohou přispívat k apoptické smrti buněk díky uvolnění cytochromu c a vyvázání anti-apoptického proteinu Bcl-2 (Federico a kol, 2012; Mwyderman a Chen, 2014).

### 3.6 Leberova hereditární optická neuropatie

Leberova hereditární optická neuropatie (LHON) je způsobena mutací DNA a řadí se mezi typická mitochondriální onemocnění. Jedná se o vzácné onemocnění, které se objevuje mezi patnáctým až pětatřicátým rokem. Postižení začíná nejdříve na jednom oku a během krátké doby se rozvíjí i na druhém oku. Postižení se z počátku rozvíjí většinou skrytě, bezbolestně a projeví se až náhlým výpadkem zraku ve středu zorného pole a v jeho okolí (Cerelli a kol., 2004).

Onemocnění je způsobeno mutací v podjednotkách NADPH-dehydrogenázy v mtDNA a jeho neuropatologie souvisí s retinálními gangliovými buňkami, retinálním pigmentovým

epitelem a fotoreceptorovou vrstvou. Atrofie těl neuronů a axonů je způsobená demyelinizací a degenerací optického nervu. Poškozená aktivita glutamátového transportéru EAAT1 (z angl. *Excitatory amino acid transporter*) patřící mezi transportéry excitačních aminokyselin a zvýšená hladina ROS způsobují apoptózu retinálních gangliových buněk. Dalším faktorem souvisejícím s LHON je narušení regulace vápníku. K poškození axonů také přispívá snížení zásobování buněk energií v podobě ATP. Na rozvoji onemocnění se mohou podílet i vlivy vnějšího prostředí (strava, kouření, toxiny, léky a další) (Federico a kol, 2012).

### **3.7 Autozomálně dominantně dědičná optická atrofie**

Autozomálně dominantně dědičná optická atrofie (z angl. *Autosomal dominant optic atrophy*, ADOA) je pomalu se rozvíjející oční neuropatie s nástupem již v první dekádě pacientova života. Toto onemocnění se projevuje sníženou zrakovou ostrostí, poruchou barevného vidění a výpadkem zrakového pole (centrocekální skotom). ADOA bývá spojována s genem OPA1, který kóduje mitochondriální GTP-vázající protein dynamin, který se účastní mitochondriální fúze, výstavby krist, apoptózy a ochrany mtDNA. Přesný mechanismus vzniku ADOA není zatím zcela znám, ale několik studií naznačuje podobnosti s LHON. Experimenty na fibroblastech nesoucích OPA1 mutace u ADOA pacientů ukázaly poruchy v oxidační fosforylaci a v mitochondriálním membránovém potenciálu a také nestabilitu mtDNA. Dále byly zjištěny změny v mitochondriální síti, zvýšená citlivost k signálům apoptózy a snížení schopnosti pro mitochondriální fúzi prostřednictvím OPA1 (Alexander a kol., 2000; Federico a kol, 2012).

### **3.8 Charcot- Marie- Tooth dědičná neuropatie typu 2**

Charcot-Marie-Tooth dědičná neuropatie typu 2 (CMT2A; také Charcot-Marie-Tooth syndrom) je periferní neuropatie s časným nástupem autozomálně dominantním typem dědičnosti. To znamená, že pokud jeden z rodičů trpí tímto onemocněním, tak je tu 50% pravděpodobnost, že jej přeneše na svého potomka. U pacientů s CMT dochází k postupnému zhoršení hybnosti dolních a posléze i horních končetin v důsledku poškození periferních nervů (Mazanec a kol., 2009)

Mutace lokusu CMT2A bývá spojována s Mfn-2, který může přímo ovlivňovat biogenezi mitochondrií prostřednictvím exprese podjednotek dýchacího řetězce. U pacientů s CMT2A

byly prokázány degenerace dlouhých periferních axonů a mitochondrií obsažených v axonech (Federico a kol, 2012).

### 3.9 Myoklonická epilepsie s „*ragged-red*“ vlákny

Myoklonická epilepsie s *ragged-red* vlákny (MERRF) je progresivní vrozená mitochondriální encefalomyopatie. Toto velmi vzácné onemocnění je způsobené tranzicí (záměnou) mezi nukleotidy A a G v MTTK genu mtDNA. U pacientů se vyskytují degenerace olivo-cerebellární dráhy se ztrátou neuronů v komplexu olivárních jader (jedná se o párová vyvýšení v oblasti prodloužené míchy), dále i v Purkyňových buňkách a v *nucleus dentatus*. Nejčastější příčinou tohoto onemocnění je mutace v tRNA pro lysin, respektive leucin. Mutace v mtDNA mají za následek poškození syntézy mitochondriálních proteinů, které způsobují selhávání funkce elektronového transportního řetězce. Toto poškození vede k poklesu mitochondriálního membránového potenciálu a k poklesu produkce ATP. Nastávají také změny v homeostáze vápníku, dochází k formování ROS, které vedou ke zvýšení apoptózy (Federico a kol, 2012; Ješina a kol., 2010).

### 3.10 Ataxie

Ataxie je symptom, který se může vyskytovat u různých neurologických poruch, např. mozečkových, vestibulárních a thalamických lézí, při postižení parietálních laloků atd. Ataxie může v některých případech postihovat pouze stoj a chůzi, jindy také pohyb končetin a řeč (Paulasová Schwabová a Danková, 2017).

Všeobecně jsou ataxie častými klinickými důsledky primárně mitochondriálních poruch. Purkyňovy a další buňky mozečku jsou citlivé na poškození mitochondriálního dýchacího řetězce. Mnoho mutací mtDNA může vést k ataxii. Nečastějšími a nejlépe klinicky a geneticky popsány jsou syndrom Kearnsův-Sayereův, dále pak MELAS (syndrom mitochondriální encefalomyopatie s laktátovou acidózou a „*stroke-like*“ atakami), již dříve popsány MERRF syndrom a *retinitis pigmentosa*. Syndrom MELAS, stejně jako syndrom MERRF, vyvolávají mutace tRNA pro lysin, resp. leucin (Federico a kol, 2012; Ješina a kol., 2010).

Za tyto poruchy mohou být zodpovědné mutace v genu POLG1. Tento gen kóduje katalytickou podjednotku polymerázy  $\gamma$  a hlavním příznakem mutací v tomto genu jsou ataxie (Federico a kol, 2012).

Mozečková ataxie, mentální retardace a hypogonadismus v dětství nebo v dospělosti mohou také souviset s deficitem koenzymu Q10. Koenzym Q10 je důležitým elektronovým přenašečem v mitochondriálním dýchacím řetězci a má také antioxidační účinky v buněčných membránách (Federico a kol, 2012).



## **4. Mitochondriální dysfunkce u nedegenerativních poškození mozku**

### **4.1 Cévní mozková příhoda**

Cévní mozková příhoda (CMP) a její nejzávažnější forma mozkový infarkt jsou stavy, kdy dochází ke snížení nebo zastavení průtoku krve do tkáně mozku, tedy k tzv. ischemii. Rozlišujeme dva typy ischemie, globální a lokální (regionální; fokální). Globální ischemie postihuje širokou oblast mozku a regionální ischemie vzniká pouze v ohraničené části mozku. Ischemie a zvýšené hromadění metabolických odpadů vede k špatnému zásobování mozkové tkáně kyslíkem a živinami. Tento stav se nazývá mozkovou hypoxií, jež může způsobit buněčnou smrt mozkové tkáně. V důsledku ischemických podmínek dochází k silnému potlačení metabolických procesů a vzniká energetická krize, která má za následek potlačení vizuálních, kognitivních a neuromuskulárních funkcí. Je pravděpodobné, že snížené neuromuskulární a kognitivní funkce jsou přinejmenším zčásti způsobeny mitochondriálními dysfunkcemi v důsledku hypoxií vyvolaném snížení mitochondriální fúze a/nebo zvýšeným oxidačním stresem. Oxidační stres je schopen poškodit činnost mitochondrií pomocí posttranslačních modifikací proteinů a oxidačním poškozením mitochondriální DNA (Akbar a kol., 2016; Kalogeris a kol., 2017).

Mozková tkáň ke své činnosti potřebuje jako zdroj energie ATP. Bohužel v mozkové tkáni neexistují žádné mechanismy, které by byly schopny vyrábět glukózu za anaerobních podmínek (např. prostřednictvím glukoneogeneze v játrech) a tím by byla hrazena potřeba ATP. Pro mozek je tedy enormně důležitá správná cirkulace a okysličování krve. Během ischemie poklesne hladina ATP pod prahovou hodnotu a obnovení na původní hodnotu trvá dlouhou dobu, i přes prodlouženou dobu reperfúze. Při nedostatku nebo snížení ATP mozkové buňky ztrácejí schopnost udržet normální elektrochemický gradient, což vede ke zvýšené propustnosti membrán s obrovským přísunem vápníku do cytosolu následovaném hromaděním glutamátu a močoviny. Je pravděpodobné, že poškození neuronů peroxynitritem může probíhat již během reperfúzní fáze po proběhlé ischemii. Dále aktivita mitochondriálního komplexu I a IV je snížena vlivem nitrosylace a/nebo nitrace proteinů, která probíhá při reperfúzi, což vede k mitochondriálním dysfunkcím a potlačení dýchacího řetězce. Navíc dochází k uvolňování cytochromu c do cytosolu, kde dochází ke stimulaci kaspáz, které zahajují buněčnou smrt. Hromadění odpadních produktů má za následek zpomalení průtoku krve nebo prasknutí krevní cévy v mozku. Všechny tyto změny během

ischenicko-reperfúzního procesu mohou způsobit okamžitou ztrátu vědomí a nevratné nervové poškození (Akbar a kol., 2016).

Superoxiddismutáza s manganem (MnSOD2) je mitochondriální enzym, který zodpovídá za eliminaci škodlivých superoxidových radikálů. Použitím mimetik s MnSOD2 je možné předejít apoptóze a snížit důsledky mozkové ischémie pomocí správného redoxního stavu v mitochondriích. MnSOD2 je schopna snížit hladinu ROS, které jsou tvořeny při mozkové ischémii a proto je velice důležitá pro udržení správné činnosti mitochondrií (Akbar a kol., 2016).

## 4.2 Traumatické poranění mozku

Traumatické poranění mozku (TPM) je získané poranění mozku, které vzniká vnějším fyzickým traumatem. Při TPM dochází k dočasnému nebo trvalému poškození kognitivních funkcí. Po TPM hrozí nebezpečí otoků a vyplavování prozánětlivých cytokinů, které podporují projevy zánětu a následné poškození buněk. Mitochondrie patří mezi vysoce zranitelné orgány následkem TPM. Experimentální modely TPM potvrdily značné strukturální a funkční poškození mitochondrií i to, že přežití mozku je úzce spojeno s mitochondriální homeostázou. V časně fázi TPM dochází k bobtnání mitochondrií a to jak u experimentálních modelů, tak u vzorků mozků pacientů s TPM. Po TPM hrozí riziko sekundárního poškození v podobě ROS a dále může být spuštěna produkce iNOs a s tím souvisí zvýšení množství NO a vznik peroxynitritu. Peroxynitrit poškozuje mitochondriální dýchání pomocí inhibice komplexu I, III a V. Zvýšený NO je schopen snížit ATP nitrací způsobeným potlačením ATP syntézy a/nebo polymerázy PARP-1 v neuronech (Akbar a kol., 2016; Fehily a Fitzgerald, 2017).

Sekundární poškození vyplývající z oxidačního stresu narušují řetězce DNA, které aktivují PARP-1, které mohou způsobit další poškození DNA. Aktivované PARP-1 vyčerpávají energetické zásoby buněk, což vede k buněčné smrti. Při glykolýze je konečným produktem pyruvát, který je redukován na laktát nebo vstupuje do Krebsova cyklu, kde je oxidován na  $\text{CO}_2$  a  $\text{H}_2\text{O}$ . Mitochondriální pyruvátdehydrogenáza (PDH) katalyzuje reakci přeměny pyruvátu na acetylkoenzym A a je důležitým enzymem spojujícím cytosolovou glykolýzu a mitochondriální Krebsův cyklus. Tento enzym může být během oxidačního stresu pozměněn posttranslačními změnami, což způsobuje jeho inaktivaci. Inaktivovaná PHD, i přes dostatečné množství kyslíku, omezuje přechod substrátu do Krebsova cyklu, čímž vzniká hromadění pyruvátu, tvorba laktátu a postupné snižování až zastavení tvorby ATP. U

experimentálních modelů i pacientů s TPM byly naměřeny snížené respirační hodnoty a snížená produkce ATP mitochondriemi. Zvýšená koncentrace poměru laktát/pyruvát a zvýšená hladina extracelulárního laktátu v mozku byla zjištěna i v těch případech TPM, kdy krevní oběh mozku a okysličení tkání bylo v rámci normálních hodnot. Lze říci, že mitochondrie hrají stěžejní roli v narušeném metabolismu vyvolaném TPM a toto narušení přispívá ke vzniku smrti nervových buněk (Akbar a kol., 2016).

## 5. Závěr

V posledních letech bylo získáno mnoho nových poznatků o vlivu mitochondriálních dysfunkcí na patogenezi neurodegenerativních onemocnění. Tato svojí podstatou heterogenní onemocnění vznikají kombinací více patogenetických dějů, mezi které je nutno zařadit i narušené funkce mitochondrií. Mitochondriální dysfunkce jsou důsledkem spolupůsobení řady faktorů, především pak oxidačního stresu. Poškozené funkce mitochondrií nesouvisí pouze s neurodegenerativními onemocněními, ale i s jinými chorobami centrálního nervového systému. Přes značný nárůst recentních poznatků není doposud zcela objasněn vztah mezi mitochondriálními dysfunkcemi a genezí neurodegenerativních onemocnění, ale i podíl tohoto mechanismu na patofyziologii cévní mozkové příhody či traumatu mozku. Z tohoto zjištění vyplývá důležitost správné mitochondriální funkce v lidském organismu a nutnost dalších nových studií zaměřených na bližší objasnění složitých mechanismů odehrávajících se v mitochondriích.

## 6. Použité zkratky

AIF	faktor vyvolávající apoptózu
AMPA	$\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionová kyselina
APP	amyloidový prekurzorový protein
ATP	adenosintrifosfát
Bcl-2	anti-apoptický protein
BDNF	mozkový neurotrofíní faktor
BER	vyštěpovací oprava báze
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DLP1	dynamamin like protein 1
DR	opakování vazebného místa pro mikrotubuly
Drp1	protein příbuzný dynaminu
EAAT1	glutamátový transportér
Fis1	protein dělení
FXN	gen kódující frataxin
GSH	glutation
GTP	guanosintrifosfát
Hap1	Huntingtin-associated protein 1
Hsp	protein tepelného šoku
HTT	gen kódující protein huntingtin
IL1	interleukin 1
IL1 $\beta$	interleukin 1 $\beta$
IL6	interleukin 6
JNK	c-Jun N-terminální kináza
kDa	kilodalton

MAPKs	mitogenem aktivované proteinkinázy
MAPT	gen kódující protein tau
MCI	mírná kognitivní porucha
MELAS	syndrom mitochondriální encefalomyopatie s laktátovou acidózou a „stroke-like“ atakami, progresivní vrozená mitochondriální encefalomyopatie
MERRF	myoklonická epilepsie s ragged-red vlákny, progresivní vrozená mitochondriální encefalomyopatie
Mf1	mitofusin 1
Mf2	mitofusin 2
mHtt	mutovaný huntingtin
MMP-3	matrixová metoloproteináza 3
MPTP	mitochondriální permeabilní tranzitní pór
mtDNA	mitochondriální DNA
MTH1	7,8-dihydro-8-oxoguanine trifosfatáza
MTTK	gen kódující tRNA pro lysin
MUTYH	mutY DNA glykosyláza
NK- $\kappa$ B	nukleární faktor kappa B
NMDA	N-methyl-D-asparagová kyselina
NOS	NO- synthasa
Nrf2	nuclear factor erythroid 2-related factor
OGG1	8-oxoguanine DNA glycosyláza
OPA1	protein optic atrophy 1
Pael-R	Parkin-associated endothelium- receptor like receptor
PARP-1	poly-(ADP-ribóza) polymeráza 1
PGC1 $\alpha$	transkripční faktor biogeneze mitochondrií
POLG1	mitochondriální DNA polymeráza $\gamma$

PRNP	gen kódující prionový protein
PrP	prionový protein
PrP <sup>c</sup>	tkáňový prionový protein
PrP <sup>Sc</sup>	patologicky změněný prionový protein
RNA	ribonukleová kyselina
RNS	reaktivní formy dusíku
ROS	reaktivní formy kyslíku
SSB	single strand binding protein
TDP-43	transaktivní DNA vázající protein o délce 43 kDa
TNF- $\alpha$	tumor nekrotizující faktor
tRNA	transferová RNA
XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis
YFH1	kvasinkový homolog frataxinu

## **7. Seznam tabulek**

**Tabulka 1:** Rozdělení neurodegenerativních onemocnění



## 8. Seznam použité literatury

1. ABOLHASSANI, N., LEON, J., SHENG, Z., OKA, S., HAMASAKI, H., IWAKI, T., NAKABEPPU, Y.: Molecular pathophysiology of impaired glucose metabolism, mitochondrial dysfunction, and oxidative DNA damage in Alzheimer's disease brain. *Mechanisms Aging&Development*, 2015, 161, 95-104 s.
2. AKBAR, M., ESSAB, M. M., DARADKEHB, G., ABDELMEGEED M. A., CHOI, Y., MAHMOOD, L., SONG, B-J.: Mitochondrial dysfunction and cell death in neurodegenerative diseases through nitroxidative stress. *Brain Research*, 2016, 1637, 34-55 s.
3. ALEXANDER, C., VOTRUBA, M., PESCH, U. E. A., THISELTON, D. L., MAYER, S., MOORE, A., RODRIGUEZ, M., KELLNER, U., LEO-KOTTLER, B., AUBURGER, G., BHATTACHARYA, S. S., WISSINGER, B.: *OPA1*, encoding a dynamin-related GTPase, is mutated in autosomal dominant optic atrophy linked to chromosome 3q28. *Nature Genetics*, 2000, 26, 211–215 s.
4. ARUOMA, O. I.: Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. *Journal of the American Oil Chemist's Society*, 1998, 75, 199–212 s.
5. BAUMGARTNER, D., MARUSIČ, P., MAZANEC, R.: Kmenové buňky v léčbě amyotrofické laterální sklerózy – přehled současných klinických zkušeností. *Česká a slovenská neurologie a neurochirurgie*, 2017, 80, 27-33 s.
6. BHAT, A. H., DAR, K. B., ANEES, S., ZARGAR, M. A., MASOOD, A., SOFI, M. A., GANIE, S. A.: Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and neurodegenerative diseases: A mechanistic insight. *Biomedicine&Pharmacotherapy*, 2015, 74, 101-110 s.
7. BÜRK, K.: Friedreich Ataxia: current status and future prospects. *Cerebellum & Ataxias*, 2017, 4, 4.
8. CADENAS, E., DAVIES, K. J.A.: Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radical Biology and Medicine*, 2000, 29, 222-230 s.

9. CARELLI, V., ROSS-CISNEROS, F.N., SADUN, A.A.: Mitochondrial dysfunction as a cause of optic neuropathies. *Progress in Retinal and Eye Research*, 2004, 23, 53-89 s.
10. COSKUN, P., WYREMBAK, J., SCHRINER, S., CHEN, H-W., MARCINIACK, C., LAFERLA, F., WALLACE, D. C. A.: Mitochondrial Etiology of Alzheimer and Parkinson Disease. *Biochimica Biophysica Acta*, 2012, 1820, 553–564 s.
11. DYLEVSKÝ, I.: Somatologie. Olomouc: Epava, 2000, 21 s., ISBN 80-86297-05-5.
12. FEDERICO, A., CARDAIOLI, E., DA POZZO, P., FORMICHI, P., GALLUS, G.N., RADI, E.: Mitochondria, oxidative stress and neurodegeneration. *Journal of the Neurological Sciences*, 2012, 322, 254–262 s.
13. FEHILY, B., FITZGERALD, M.: Repeated Mild Traumatic Brain Injury: Potential Mechanisms of Damage. *Cell Transplantation*, 2017, 26, 1131–1155 s.
14. FIALA, O., RŮŽIČKA, E.: Genetika Parkinsonovy nemoci. *Česká a Slovenská Neurologie a Neurochirurgie*, 2009, 72, 419-428 s.
15. FIŠAR, Z., HROUDOVÁ, J., RABOCH, J.: Úloha mitochondrií v mechanismech synaptické plasticity, buněčného poškození a poruch nálady. *Česká a slovenská Psychiatrie*, 107, 2011, 14-27 s.
16. GARCÍA-ESCUADERO, V., MARTÍN-MAESTRO, P., PERRY, G., AVILA, J.: Deconstructing Mitochondrial Dysfunction in Alzheimer Disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2013, 13, 1-13 s.
17. GERMAIN, M.: OPA1 and mitochondrial solute carriers in bioenergetic metabolism. *Molecular & Cellular Oncology*, 2015, 2, 1-3 s.
18. GRÜNEWALD, A., RYGIEL, K., HEPPLWHITE, P. D., MORRIS, C. M., PICARD, M., TURNBULL, D. M.: Mitochondrial DNA Depletion in Respiratory

Chain-Deficient Parkinson Disease Neurons. *Annals of Neurology*, 2016, 79, 366–378 s.

19. CHENG, A., HOU, Y., MATTSON, M. P.: Mitochondria and neuroplasticity. *ASNNEURO*, 2010, 2, 243-256 s.
20. JEŠINA, P., VINŠOVÁ, K., BRANTOVÁ, O., TESAŘOVÁ, M., HÁJKOVÁ, Z., HANSÍKOVÁ, H., WENCHICH, L., HONZÍK, T., MAGNER, M., ZÁMEČNÍK, J., RYŠKA, P., ZEMAN, J.: Myoklonická epilepsie a hluchota u sourozenců s mutací 7512T>C v genu pro mitochondriální tRNA<sup>Ser(UCN)</sup> – kazuistiky. *Česká a slovenská neurologie a neurochirurgie*, 2010, 73, 68-72 s.
21. KALOGERIS, T., BAINES, C. P., KRENZ, M., KORTHUIS, R. J.: Ischemia/Reperfusion. *Comparative Physiology*, 2017, 7, 113–170 s.
22. KONRÁD, J.: Demence s Lewyho tělísky, diagnostika, klinický význam, možnost léčby, kazuistika. *Psychiatrie pro Praxi*, 2004, 1, 9-11 s.
23. KOUKOLÍK, F., JIRÁK, R.: Alzheimerova nemoc a jiné demence. Praha: Grada Publishing, 1998, 27, 45, 46, 159, 171, 172, 176 s., ISBN 80-7169-615-3.
24. MARKOVÁ, M., HANSÍKOVÁ, H.: Úloha mitochondrií v patogenezi Huntingtonovy choroby. *Klinická biochemie a metabolismus*, 2016, 24, 27-31 s.
25. MARTELLO, A., PUCCIO, H.: Dysregulation of cellular iron metabolism in Friedreich ataxia: from primary iron-sulfur cluster deficit to mitochondrial iron accumulation. *Frontiers in Pharmacology*, 2014, 5, 130.
26. MARTIN, B., CHADWICK, W., CONG, W., PANTALEO, N., DAIMON, C. M., GOLDEN, E. J., BECKER, K. G., WOOD, W. H., CARLSON, O. D., EGAN, J. M., MAUDSLEY, S.: Euglycemic Agent-mediated Hypothalamic Transcriptomic Manipulation in the N171– 82Q Model of Huntington Disease Is Related to Their Physiological Efficacy. *Journal Of Biological Chemistry*, 2012, 287, 31766 –31782 s.

27. MATĚJ, R., RUSINA, R.: Neurodegenerativní onemocnění: přehled současné klasifikace a diagnostických neuropatologických kritérií. *Česká Patologie*, 2012, 48, 83-90 s.
28. MATSON, M. P., GLEICHMANN, M., CHENG, A.: Mitochondria in neuroplasticity and neurological disorders. *Neuron*, 2008, 60, 748-766 s.
29. MAZANEC, R., HORÁČEK, O., KOBESOVÁ, A., SMETANA, P.: Hereditární neuropatie. *Česká a slovenská neurologie a neurochirurgie*, 2009, 72, 5-17 s.
30. MENŠÍKOVÁ, K., KAŇOVSKÝ, P., KAISEROVÁ, M., NESTRAŠIL, I., BAREŠ, M.: Proměnlivá tvář parkinsonské neurodegenerace. *Česká a slovenská neurologie a neurochirurgie*, 2013, 76, 26-34 s.
31. MENŠÍKOVÁ, K., TUČKOVÁ, L., KAŇOVSKÝ, P.: Atypický parkinsonismus a frontotemporální demence – klinické, patologické a genetické aspekty. *Česká a slovenská neurologie a neurochirurgie*, 2016, 79, 275– 286 s.
32. McKEITH, I. G.: Dementia with Lewy bodies. *British Journal of Psychiatry*, 2002, 180, 144-147 s.
33. MOUREK, J.: Fyziologie. Praha: Grada Publishing, 2012, 143, 144, 145, 151, 152 s., ISBN 978-80-247-3918-2.
34. MUYDERMAN, H., CHEN, T.: Mitochondrial dysfunction in amyotrophic lateral sclerosis – a valid pharmacological target?. *British Journal of Pharmacology*, 2014, 171, 2191–2205 s.
35. OPLETAL, L., CHLEBEK, J., MACÁKOVÁ, K., BENEŠOVÁ, N., HOŠŤÁLKOVÁ, A., CAHLÍKOVÁ, L.: Antioxidanty a degenerativní onemocnění. *Praktické lékařství*, 2013, 9(3), 135–138 s.

36. PAULASOVÁ SCHWABOVÁ, J., DANKOVÁ M.: Ataxie. *Česká a slovenská neurologie a neurochirurgie*, 2017, 80, 164-170 s.
37. PAVLOV, P. F., PETERSEN, C. H., GLASER, E., ANKARCRONA, M.: Mitochondrial accumulation of APP and A $\beta$ : significance for Alzheimer disease pathogenesis. *Journal Cellular and Molecular Medicine*, 2009, 13, 4137-4145 s.
38. RAYMOND, L. A., ANDRÉ, V. M., CEPEDA, C., GLADDING, C. M., MILNERWOOD, A. J., LEVINE, M. S.: Pathophysiology of Huntington's disease: Time-dependent alterations in synaptic and receptor function. *Neuroscience*, 2011, 198: 252–273 s.
39. ROHAN, Z., PAROUBKOVÁ E., JOHANIDESOVÁ, S., KOUKOLÍK, F., MATĚJ, R., RUSINA, R.: Lidské prionové nemoci v České republice – 10 let zkušeností s diagnostikou. *Česká a slovenská neurologie a neurochirurgie*, 2013, 76, 300-306 s.
40. ROHAN, Z., MATĚJ, R., RUSINA, R.: Překrývání neurodegenerativních demencí. *Česká a slovenská neurologie a neurochirurgie*, 2015, 78, 641– 648 s.
41. RUSINA, R., MATĚJ, R., RŮŽIČKA, E., ROTH, J.: Diferenciální diagnostika tauopatií- klinický pohled. *Česká a slovenská neurologie a neurochirurgie*, 2015, 78, 526–535 s.
42. SCHWABOVÁ, J., MALÝ, T., ZAHÁLKA, F., MUŠOVÁ, Z., APLTOVÁ, L., KOMÁREK, V., ZUMROVÁ, A.: Význam zadně provazcové symptomatiky v diferenciální diagnostice hereditárních ataxií. *Česká a slovenská neurologie a neurochirurgie*, 2013, 76, 336-342 s.
43. STRAM, A. R., PAYNE, M. R.: Posttranslational modifications in mitochondria: Protein signaling in the powerhouse. *Cell Molecular Life Sciences*, 2016, 73, 4063–4073 s.
44. SUBRAMANIAM, S. R., CHESSELET, M-F.: Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in Parkinsons disease. *Progr. Neurobiol.*, 2013, 106-107, 17-32 s.

45. TROJAN, S., LANGMEIER, M.: Lékařská fyziologie. Praha: Grada Publishing, 1996, 14 a 15 s., ISBN 80-7169-311-1.
46. WANG, J-Q., CHEN, Q., WANG, X., WANG, Q-C., WANG, Y., CHENG, H-P., GUO, C., SUN, Q., CHEN, Q., TANG, T-S.: Dysregulation of Mitochondrial Calcium Signaling and Superoxide Flashes Cause Mitochondrial Genomic DNA Damage in Huntington Disease. *Journal Of Biological Chemistry*, 2013, 288, 3070–3084 s.
47. WANG, X., WANG, W., LI, L., PERRY, G., LEE, H. G., ZHU, X.: Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. *Biochimica&Biophysica Acta*, 2014, 1842, 1240-1247 s.
48. YANA, M. H., WANG, X., ZHUA, X.: Mitochondrial defects and oxidative stress in Alzheimer disease and Parkinson disease. *Free Radic Biol Med.*, 2013, 62, 90–101 s.
49. YILDIZ-UNAL, A., KORULU, S., KARABAY, A.: Neuroprotective strategies against calpain-mediated neurodegeneration. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, 2015, 11, 297-310 s.