

ZMĚNY MITOCHONDRIÁLNÍCH FUNKCÍ U PACIENTŮ V MANICKÉ FÁZI BIPOLÁRNÍ AFEKTIVNÍ PORUCHY

původní práce

Eva Kitzlerová¹
Jana Hroudová^{1,2}
Zdeněk Fišar¹
Hana Hansíková³
Lucie Kališová¹
Martina Zvěřová¹
Alena Lambertová¹
Jiří Raboch¹

¹Psychiatrická klinika 1. LF UK a VFN, Praha

²Farmakologický ústav 1. LF UK a VFN, Praha

³Klinika dětského a dorostového lékařství 1. LF UK a VFN, Praha

Kontaktní adresa:

doc. PharmDr. Jana Hroudová, Ph.D.
Psychiatrická klinika 1. LF UK a VFN
Ke Karlovu 11
120 00 Praha 2
e-mail: hroudova.jana@gmail.com

Práce byla podpořena grantem AZV 15-28616A MZ ČR a výzkumnými projekty MZ ČR – RVO VFN64165, Q27/LF1 a Progres Q26/LF1.

SOUHRN

Kitzlerová E, Hroudová J, Fišar Z, Hansíková H, Kališová L, Zvěřová M, Lambertová A, Raboch J. Změny mitochondriálních funkcí u pacientů v manické fázi bipolární afektivní poruchy

Úvod: Příčiny vzniku bipolární afektivní poruchy (BAP) jsou multifaktoriální a nebyly dosud plně objasněny. Na patofyziologii BAP se mohou podílet také mitochondriální dysfunkce.

Metoda: Měřili jsme vybrané mitochondriální parametry v trombocytech izolovaných z periferní krve u pacientů trpících manickou fází BAP, v jejich remisi a u zdravých kontrol. BAP byla klinicky hodnocena pomocí diagnostických škál a dotazníků. Aktivita citrát syntázy (CS) a elektronového transportního systému (ETS) – komplexů I, II, a IV byly měřeny spektrofotometricky. Mitochondriální respirace byla zkoumána v intaktních a permeabilizovaných trombocytech za použití respirometrie s vysokým rozlišením.

Výsledky: Aktivita komplexů II, IV a CS byly u pacientů s BAP sníženy, aktivita komplexu I byla zvýšena, a poměr komplexu I k CS byl signifikantně zvýšen. V intaktních trombocytech byly respirace po inhibici komplexu I a reziduální spotřeba kyslíku sníženy u pacientů s BAP ve srovnání se zdravými kontrolami. V permeabilizovaných trombocytech byla prokázána snížená kapacita ETS u pacientů s BAP. Nebyly prokázány signifikantní rozdíly mezi pacienty s manickou fází BAP a pacienty v remisi.

SUMMARY

Kitzlerová E, Hroudová J, Fišar Z, Hansíková H, Kališová L, Zvěřová M, Lambertová A, Raboch J. Changes of mitochondrial functions in patients suffering from manic episode of bipolar affective disorder

Introduction: The reasons for bipolar affective disorder (BAD) development are multifactorial and have not been fully clarified. Mitochondrial dysfunctions can be implicated in pathophysiology of BAD.

Method: We measured selected mitochondrial parameters in blood platelets isolated from peripheral blood. The analyses were performed for patients suffering from a manic episode during remission and were compared to those performed for healthy controls. BAD was clinically evaluated using well-established diagnostic scales and questionnaires. Activities of electron transport system (ETS) complexes – complex I, II, and IV and citrate synthase (CS) were examined spectrophotometrically. Mitochondrial respiration was examined in intact and permeabilized blood platelets using high-resolution respirometry.

Results: The CS, complex II and complex IV activities were decreased in the BAD patients, complex I activity was increased, and the ratio of complex I to CS was significantly increased. In the intact platelets, respiration after complex I inhibition and residual oxygen consumption were decreased in the BAD patients compared to the healthy controls. In the

Závěr: Pokles kapacity ETS u pacientů s BAP lze vysvětlit nedostatečnou funkcí enzymů citrátového cyklu a enzymových komplexů systému oxidativní fosforylace. Zvýšení aktivity komplexu I by mohl představovat kompenzační mechanismus ke sníženým aktivitám CS a narušené funkci komplexů II a IV. Předpokládáme, že komplex I a změny v jeho aktivitě přispívají k eliminaci poruch buněčného energetického metabolismu při BAP způsobených nedostatečným fungováním komplexů II a IV. Sledované parametry by měly být dále zkoumány jako „trait“ markery BAP.

Klíčová slova: bipolární afektivní porucha, mánie, trombocyty, mitochondrie, komplexy elektronového transportního řetězce, rychlost respirace.

permeabilized platelets, a decreased ETS capacity was found in the BAD patients. No significant differences were found between BAD patients in mania and remission.

Conclusion: Increased complex I activity can be a compensatory mechanism for decreased CS and complex II and IV activities. We conclude that complex I and its abnormal activity contribute to elimination of defects in cellular energy metabolism during a manic episode and that the deficiency in the complex's II and IV functioning. The availability of oxidative phosphorylation substrates, seems to be not responsible for the decreased ETS capacity in BAD patients. The observed parameters can be further evaluated as 'trait' markers of BAD.

Key words: bipolar affective disorder, mania, blood platelet, electron transport chain complexes, mitochondrion, respiratory rate.

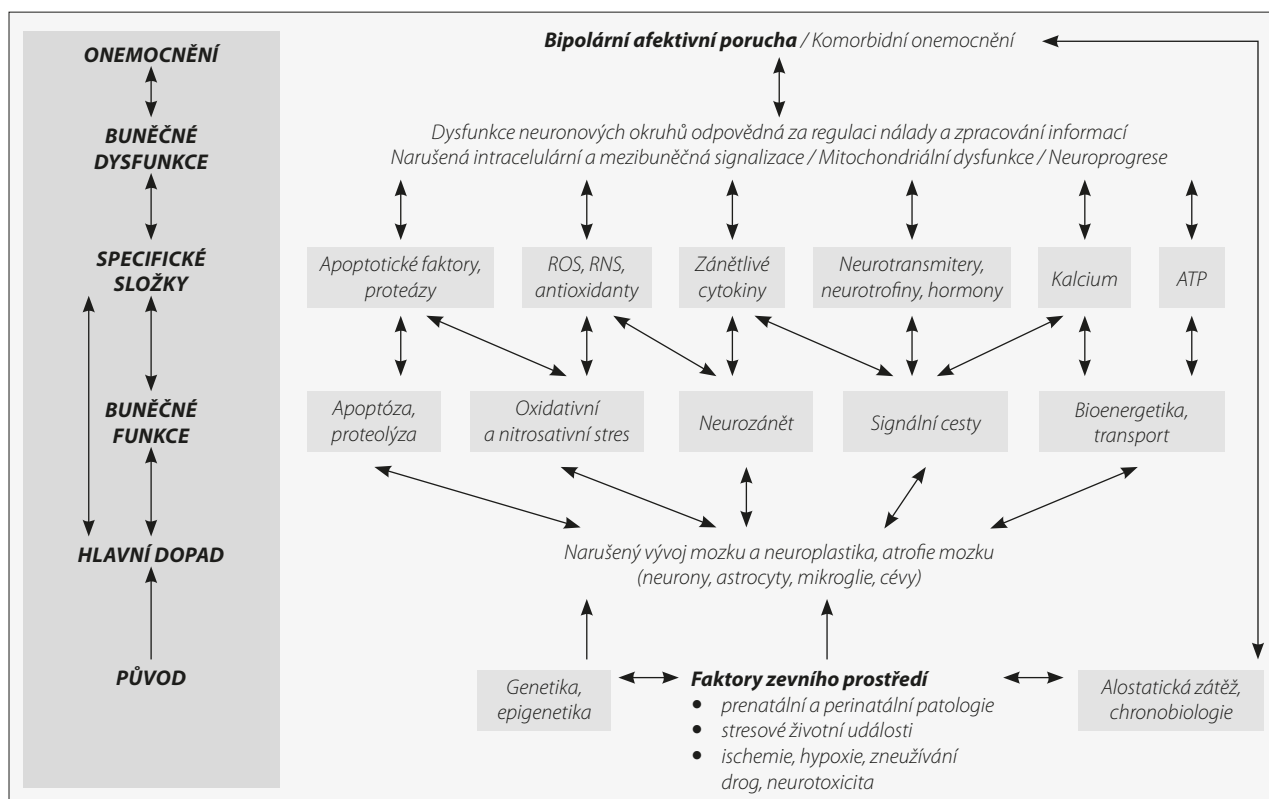
ÚVOD

Bipolární afektivní porucha (BAP) je závažné, chronické psychiatrické onemocnění, pro které je typické střídání afektivních epizod deprese a mánie či hypománie. V průběhu onemocnění se mohou u nemocných vyskytnout epizody manické, hypomanické, depresivní, rychlé cyklování, smíšené stavy a v některých závažných případech se mohou objevit i psychotické symptomy. Mánie je charakterizovaná abnormálně elevovanou, expanzivní nebo dráždivou náladou, sníženou potřebou spánku, neadekvátně zvýšeným sebevědomím, myšlenkovým tryskem, zrychleným psychomotorickým tempem, urychlenou řečí, někdy i agitovaností.¹ Diagnóza mánie může být někdy obtížná, především s ohledem na oslabený či zcela chybějící náhled nemocného, léčba pak bývá neadekvátní a důsledky nemoci (osobní, sociální, pracovní, finanční atd.) tak mohou být pro samotného nemocného i pro jeho rodinu devastující. V současné době existují dobře účinná thymopropylaktika, která zabírají rekurenci manických a depresivních epizod, někteří nemocní jsou však k této léčbě farmakorezistentní.²

Patofyziologie BAP je multifaktoriální a není dosud zcela jasná. Podílejí se na ní faktory genetické, psychosociální, biologické, významným spolupodílejícím se faktorem jsou depresogenní, stresové události v životě jedince. Mezi neuropatofyziologické cesty vedoucí ke vzniku BAP se řadí monoaminový systém, oxidativní a nitrosativní stres, mitochondriální dysfunkce, stres endoplazmatického retikula, změny v aktivitě CREB (transkripční faktor

regulující transkripci genů, např. pro mozkový neurotrofický faktor BDNF) a neurotrofickým systémem, dysregulace kalcia, neurozánětlivá odpověď a autoimunitní procesy, tryptofan a jeho metabolity a dysregulace osy hypotalamus – hypofýza – kůra nadledvin (HPA) (obr. 1). Ve studiích zabývajících se strukturálními a funkčními změnami v mozku u nemocných trpících BAP bylo zjištěno poškození neuronálních okruhů, narušení neuronální plasticity a adaptability, narušení synaptického přenosu a transdukce signálu. Zvýšení oxidativního a nitrosativního stresu, změny neurotrofinů, zánětlivých cytokinů a změny kortikosteroidní aktivity jsou prokazatelně vztaženy k mitochondriálním dysfunkcím, zánětlivým a autoimunitním procesům.^{3,4} Současné poznatky umožňují formulovat několik biologických hypotéz vzniku a rozvoje BAP na základě rozpoznání biomarkerů pro vulnerabilitu k onemocnění, rozvoj a průběh onemocnění a léčebnou odpověď. Studium těchto biomarkerů vychází z výzkumu neurovizuálních metod a hodnocení strukturálních změn mozku, z genetických studií a hodnocení polymorfismů kandidátních genů pro BAP a z výzkumu neurochemických biomarkerů detekovatelných na periférii např. z krve nemocných.⁵

Souvislost mezi mitochondriálními dysfunkcemi a psychickými chorobami byla prokázána v *in vitro* a také v *in vivo* studiích.^{6–10} Mitochondrie výrazně ovlivňují intracelulární procesy spojené s transdukcí signálu, přežíváním neuronů a neuroplasticitou. Navíc mají zásadní



Obr. 1. Faktory ovlivňující vznik a vývoj BAP

Pozn.: Bipolární porucha je charakterizována mnohočetnou spojitostí mezi narušeným vývojem mozku a poškozenou neuroplasticitou. To může být způsobeno genetickými a vnějšími faktory, aktivovanými procesy apoptózy, imunitně-zánětlivými procesy, změnami v signálních cestách mediátorů, neurotrofinů, změnami v homeostáze intracelulárního kalcia, oxidativním a nitrosativním stresem, narušenou chronobiologií a buněčnou bioenergetikou (převzato a upraveno podle⁴).

rolí při tvorbě adenosin-5'-trifosfátu (ATP), jsou zahrnuty do dalších intracelulárních procesů, jako jsou regulace tvorby reaktivních forem kyslíku (ROS), homeostáze kalcia a spouštění apoptózy.¹¹ Mitochondriální dysfunkce a poruchy oxidativního metabolismu jsou typické pro mnoho chronických onemocnění, která nemusejí patřit do kategorie mitochondriálních chorob.¹² Aktuálně diskutovaná hypotéza mitochondriální dysfunkce u BAP je založená na nálezech z magnetické rezonanční spektroskopie.^{13–15} Pokles hladin vysoce energetických fosfátů, změny intracelulárního pH a zvýšená koncentrace laktátu byly nalezeny v mozcích nemocných trpících BAP, což naznačuje narušení procesu oxidativní fosforylace (OXPHOS), pokles celkové energetické produkce a/nebo substrátové dostupnosti a posun energetické produkce směrem ke glykolýze.^{13,16}

Některé nálezy poruch mitochondriálních funkcí u nemocných trpících BAP však nejsou konzistentní.¹² Např. nebyly nalezeny rozdíly v aktivitách citrát syntázy (CS), sukcinátdehydrogenázy a malátdehydrogenázy v leukocytech u nemocných trpících depresivní fází BAP bez léčby (tzv. „drug naïve“) a u zdravých kontrol.¹⁷ Dále, aktivita komplexu I byla snížena a bylo pozorováno vyšší oxidativní poškození mitochondriálních proteinů v prefrontálním kortexu pacientů trpících BAP v porovnání s kontrolami.¹⁸

Cílem této studie bylo nalezení vztahu mezi mitochondriálními dysfunkcemi a manickými epizodami

BAP. Aktivitu CS a jednotlivých komplexů ETS a změny mitochondriálního dýchání byly zkoumány v trombocytech nemocných trpících BAP jako potenciální biologické markery afektivních poruch, které by mohly být jednoduše detekovatelné ze vzorku periferní krve těchto nemocných.

MATERIÁL A METODA

Design studie a studované kohorty

Do studie byli zahrnuti nemocní s diagnózou BAP, v akutní manické fázi, přijatí na Psychiatrickou kliniku 1. LF UK a VFN v Praze. Byli požádáni o vyplnění dotazníku zjišťujícího základní sociodemografická data, farmakologickou anamnézu, osobní návyky a aktuálně užívanou medikaci. Klinické hodnocení BAP prováděl lékař/psychiatr pomocí diagnostických škál a dotazníků – Youngovy škály mánie (Young Mania Rating Scale; YMRS), škály Celkového klinického dojem (Clinical Global Impression, Severity Scale; CGI-S) a Stručné psychiatrické hodnotící škály (Brief Psychiatric Rating Scale; BPRS). Nemocní byli testováni na příznaky akutní mánie během 5 dnů po přijetí.

Pacienti s BAP splnili následující zařazující kritéria: věk 18–65 let, bez abúzu psychoaktivních látek, bez

organického postižení a kognitivního narušení. Základní charakteristiky účastníků studie jsou uvedeny v tab. 1. Pacienti netrpěli žádnou závažnou somatickou chorobou a neužívali chronickou somatickou medikaci. Dále neužívali preparáty, které by mohly mít vliv na funkce mitochondrií, jako jsou vitamin E, koenzym Q10, L-karnitin, antibiotika (chloramfenikol, doxycyklin a fluorochinolony), imunosupresiva (azathioprin, cyklosporin, takrolimus a everolimus), monoklonální protilátky a další léky, které by mohly ovlivňovat mitochondriální metabolismus. Kontrolní skupina se skládala z věkově přiměřených zdravých dobrovolníků.

Studie byla prováděna v souladu s principy Helsinské deklarace, studijní protokol byl schválen etickou komisí 1. LF UK a VFN v Praze. Všichni pacienti podepsali informovaný souhlas k zařazení do studie.

Příprava trombocytů

Krev byla pacientům odebrána ráno, nalačno, před pozitivním ranním medikací; kouření cigaret a pití kávy bylo před odběrem zakázáno. Aktivita komplexů I, II, IV a CS byly měřeny modifikovanou metodou podle Foxe et al.¹⁹ v trombocytech izolovaných z 9 ml krve odebrané do citrátu sodného. Krev odebraná do K₂EDTA zkumavek byla použita pro měření mitochondriální respirace v trombocytech. Následně byla připravena plazma bohatá na trombocyty pomocí centrifugace při 200 × g, 15–20 minut a 25 °C.

Aktivita mitochondriálních enzymů

Citrát syntáza (EC 2.3.3.1, CS) byla měřena spektrofotometricky, metodou podle Srereho.²⁰ Určení aktivit komplexů dýchacího řetězce bylo provedeno modifikovanou metodou podle Rustina.²¹

Byly hodnoceny tyto komplexy ETS:

- Komplex I (NADH:ubichinon reduktáza; EC 1.6.5.3)
- Komplex II (sukcinátdehydrogenáza; EC 1.3.5.1)
- Komplex IV (cytochrom c oxidáza; EC 1.9.3.1)
- Aktivita těchto komplexů byly normalizovány k aktivitě CS.

Respirometrie s vysokým rozlišením

Respirační rychlost mitochondrií byla měřena při 37 °C v oxygrafu s vysokým rozlišením (Oxygraf-2k, Oroboros Instruments, Innsbruck, Rakousko), podle již zavedených metod.^{22,23} Po umístění vzorku do inkubačních komůrek byla koncentrace kyslíku monitorována v čase a byla spočítána respirační rychlost (O₂ flow per cell, respiratory rate). Stanovení buněčné respirace bylo prováděno ihned po odběru krve, při uchovávání dochází ke snížení aktivit ATP syntázy a komplexu IV.²⁴

K rozeznání konkrétních mitochondriálních dysfunkcí souvisejících se stavem buněk byla rychlost respirace normalizována a) ke koncentraci krevních destiček, b) k maximální rychlosti respirace mitochondrií.^{25,26}

A) Dýchání v intaktních trombocytech

Plazma bohatá na trombocyty byla dvakrát zředěná v KH pufru. Měřili jsme fyziologickou rychlost dýchání (PR), maximální kapacitu ETS (ETSC), respiraci

po inhibici komplexu I rotenonem (Rot) a zbytkovou spotřebu kyslíku (ROX) v intaktních trombocytech za použití modifikované metody podle Sjöwalla et al.²⁷ Jednotlivé stavy dýchání byly navozeny specifickými mitochondriálními inhibitory (oligomycinem, rotenonem a antimycinem A) a rozpřahovačem – karbonyl kyanidem *p*-trifluoromethoxyfenylhydrazonem (FCCP).

B) Dýchání v permeabilizovaných trombocytech

Plazma bohatá na trombocyty byla centrifugována 1500 × g po dobu 10 min v 25 °C; supernatant byl odstraněn a peleta resuspendována do dvouobjemového mitochondriálního respiračního média MiR05. Plazmatické membrány byly permeabilizovány 50 µg/ml digitoninu. Protokoly měření byly převzaty od Sjöwalla et al.²⁷

Respirace spojená s komplexem I byla iniciována přidáním 5 mM malátu a 5 mM pyruvátu. Respirační stav 3 byl indukován přidáním 1 mM ADP a 5 mM glutamátu (Kx I). Dále byl přidán 10 mM sukcinát k indukci respirace spojené s komplexem II; byla měřena respirační rychlost mitochondrií při vstupu elektronů přes komplex I i II (Kx I+II). Spotřeba kyslíku nezávislá na fosforylaci ADP byla měřena po přidání 2 µg/ml oligomycinu jako respirace ve stavu 4o (LEAK). Maximální kapacita ETS (ETSC) byla určena titrací pomocí FCCP (1–3 µM). Respirace spojená s komplexem I byla inhibována 0,5 µM rotenonem a byla určena ETS kapacita vztažena ke komplexu II (inhibice komplexu I, Rot). Na závěr bylo přidáno 1,25 µg/ml antimycinu A a byla měřena zbytková spotřeba kyslíku (ROX), která byla odečtena ode všech ostatních respiračních rychlostí.

Analýza dat a statistika

Data byla analyzována pomocí programu DatLab 4.3 software (Oroboros Instruments, Innsbruck, Rakousko) zaznamenávajícího koncentrace kyslíku v čase. Respirační rychlosti byly vyjádřeny v pmol O₂ spotřebovaných za sekundu a vztaženy k 10⁶ trombocytů. Po odečtení ROX byly vypočteny poměry k max. kapacitě ETS: PR/ETSC, LEAK/ETSC, NetPR = (PR-LEAK)/ETSC and Rot/ETSC u intaktních trombocytů; Kx I/ETSC, Kx I + II/ETSC, LEAK/ETSC and Rot/ETSC u permeabilizovaných trombocytů.

Všechna data jsou prezentována jako průměr ± směrodatná odchylka. Analýza dat byla provedena ve statistickém balíku R, verze 3.4.2, R Core Team, 2017.²⁸ Vzhledem k opakovaným měřením (pacient v mánii a remisi) jsou použity lineární modely se smíšenými efekty. Jako statistická jednotka je uvažován subjekt pacienta, resp. kontroly. Pro vyjádření souvislosti sledované veličiny a klinických projevů byl použit neparametrický Spearmanův korelační koeficient.

VÝSLEDKY

Do studie bylo zahrnuto 35 pacientů, ambulantní pacienti nebo pacienti hospitalizovaní s akutní manickou fází BAP. Všichni pacienti splnili kritéria pro BAP podle dotazníku „Mood Disorder Questionnaire (MDQ)“ a podstoupili

Tab. 1. Základní charakteristiky účastníků studie

| Účastníci studie | Věk | % žen | Škála YMRS | Škála CGI-01 | Škála BPRS | N |
|-----------------------------|----------------|-------------|----------------|---------------|----------------|-----|
| Pacienti v manické fázi BAP | 36,8 (SD 11,4) | 18 (51,4 %) | 23,0 (SD 11,7) | 5,6 (SD 1,10) | 63,2 (SD 16,0) | 35 |
| Pacienti v remisi BAP | 41,4 (SD 11,6) | 29 (56,9 %) | 4,2 (SD 4,2) | 2,4 (SD 0,8) | 31,3 (SD 7,6) | 51 |
| Zdravé kontroly | 41,4 (SD 12,1) | 59 (56,7 %) | – | – | – | 104 |

Pozn.: BAP – bipolární afektivní porucha; YMRS – Youngova škála mánie; CGI – celkový klinický dojem hodnotící závažnost onemocnění; BPRS – stručná psychiatrická hodnotící škála, 24položková verze, N – počet účastníků.

Škála BPRS hodnotí celkový psychický stav, zahrnuje 24 položek hodnotících závažnost psychopatologických symptomů na 7stupňové Likertově stupnici. Celkové skóre se pohybuje v rozmezí 24–168 (vyšší skóre znamenají závažnější psychopatologii).³⁹

CGI 1: škála CGI naznačuje závažnost onemocnění, 1 – normální, bez známky nemoci, 2 – hraničně nemocný, 3 – mírně nemocný, 4 – středně závažně nemocný, 5 – výrazně nemocný, 6 – závažně nemocný a 7 – extrémně závažně nemocný.⁴⁰

YMRS: výsledek škály odpovídá závažnosti onemocnění, např. skóre na škále YMRS vyšší než 25 odpovídá na škále CGI stupni více než 5 (výrazně nemocný).⁴¹

klinické hodnocení a měření mitochondriálních funkcí v trombocytech. Klinická data zahrnovala údaje ze škál YMRS, CGI, a BPRS; výsledky jsou uvedeny v tab. 1.

Aktivity komplexů dýchacího řetězce a citrát syntázy

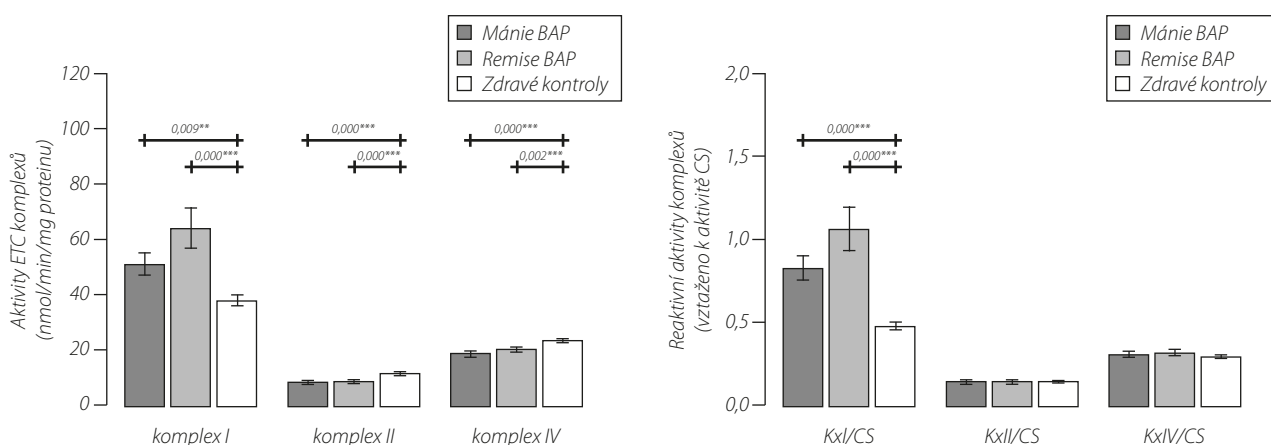
Aktivita komplexu I (mánie-M: $p = 0,009$, remise-R: $p < 0,001$) byla signifikantně zvýšená u pacientů s BAP ve srovnání se zdravými kontrolami. Aktivita komplexu II (M: $p < 0,001$, R: $p < 0,001$) a komplexu IV (M: $p < 0,001$, R: $p = 0,002$) byly signifikantně sníženy ve srovnání s kontrolami (graf 1A). Aktivita CS (M: $p < 0,001$, R: $p < 0,001$) byla snížena, proto byly aktivity komplexů též normalizovány k aktivitě CS. U pacientů s BAP byl nalezen zvýšený poměr aktivity komplexu I/CS (M: $p < 0,001$, R: $p < 0,001$) (graf 1B). Nebyly nalezeny signifikantní rozdíly mezi pacienty trpícími BAP, manickou fází a pacienty v remisi.

Respirometrie v trombocytech

V intaktních trombocytech byly parametry respirace Rot (M: $p < 0,001$, R: $p < 0,001$) a ROX (M: $p < 0,001$, R: $p < 0,001$) signifikantně sníženy u pacientů s BAP v po-

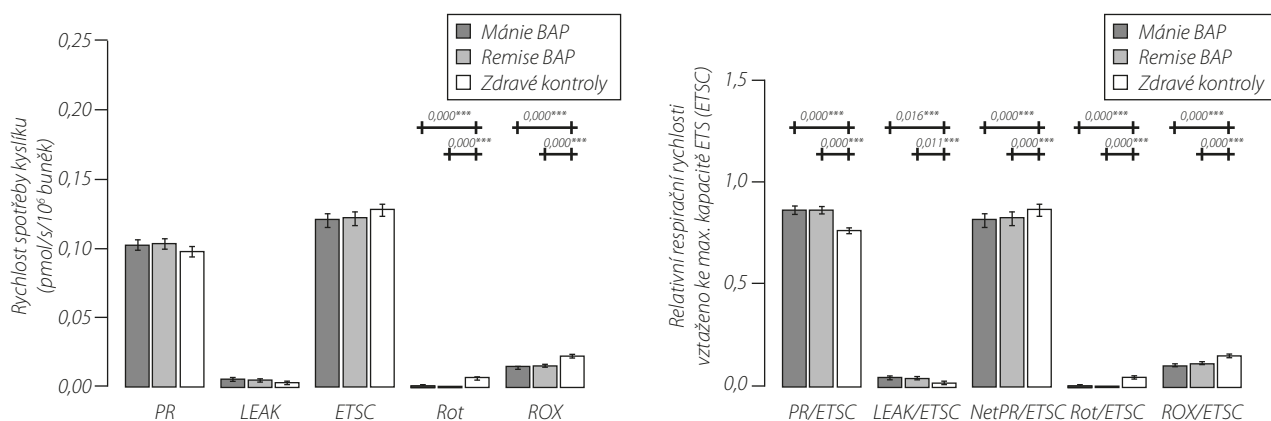
rovnání se zdravými kontrolami (graf 2A). Po normalizaci mitochondriální respirace k ETS kapacitě (ETSC), která představuje vnitřní marker funkce mitochondrií, byly poměry PR/ETSC (M: $p < 0,001$, R: $p < 0,001$), LEAK/ETSC (M: $p = 0,016$, R: $p = 0,011$) a NetPR/ETSC (M: $p < 0,001$, R: $p < 0,001$) signifikantně zvýšeny a poměry Rot/ETSC (M: $p < 0,001$, R: $p < 0,001$) a ROX/ETSC (M: $p < 0,001$, R: $p < 0,001$) signifikantně sníženy v trombocytech u pacientů s BAP (graf 2B). Nebyly zaznamenány signifikantní rozdíly mezi pacienty s BAP a pacienty v remisi.

V permeabilizovaných trombocytech byly hodnoceny: Kx I-respirace a Kx II-respirace, ETSC, LEAK, Rot a ROX. ETSC byla signifikantně snížena u osob s BAP oproti kontrolám (M: $p = 0,005$, R: $p = 0,010$) (graf 3A). Po normalizaci mitochondriální respirace k ETS kapacitě, Kx I+II/ETSC (M: $p < 0,001$, R: $p = 0,007$), Rot/ETSC (M: $p = 0,021$, R: nesignifikantně) a LEAK/ETSC (M: $p < 0,001$, R: nesignifikantně) byly zvýšeny parametry Rot/ETSC a LEAK/ETSC pouze u manických BAP pacientů ve srovnání se zdravými kontrolami. Poměr LEAK/ETSC byl signifikantně zvýšen u pacientů s manickou fází BAP ve srovnání s pacienty v remisi ($p = 0,030$) a poměr ROX/ETSC byl zvýšen u pacientů s BAP v remisi ve srovnání se zdravými kontrolami ($p = 0,030$) (graf 3B).



Grafy 1A, 1B. Aktivity mitochondriálních komplexů v krevních destičkách u pacientů s BAP v manické epizodě, v remisi a srovnávané s kontrolami

Pozn.: (A) Komplexy elektronového transportního řetězce; (B) Komplexy normalizované k aktivitě citrát syntázy (CS); **komplex I** – NADH:ubichinon reduktáza, **komplex II** – sukcinátdehydrogenáza, **komplex IV** – cytochrom c oxidáza. Data jsou prezentována jako průměrné hodnoty \pm směrodatná odchylka. Statistická významnost je označena *, kde * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$.



Grafy 2A, 2B. Mitochondriální respirace v intaktních trombocytech pacientů s BAP v mánii, v remisi a u zdravých kontrol

Pozn.: (A) Fyziologická respirace (PR), nefosforylující stav respirace (LEAK), maximální kapacita ETS (ETSC), respirace po inhibici komplexu I rotenonem (Rot), reziduální spotřeba kyslíku (ROX); (B) Poměry respiračních rychlostí vztahované k ETS kapacitě (ETSC). Data jsou prezentována jako průměrné hodnoty \pm směrodatná odchylka. Statistická významnost je označena *, kde * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$.

DISKUSE

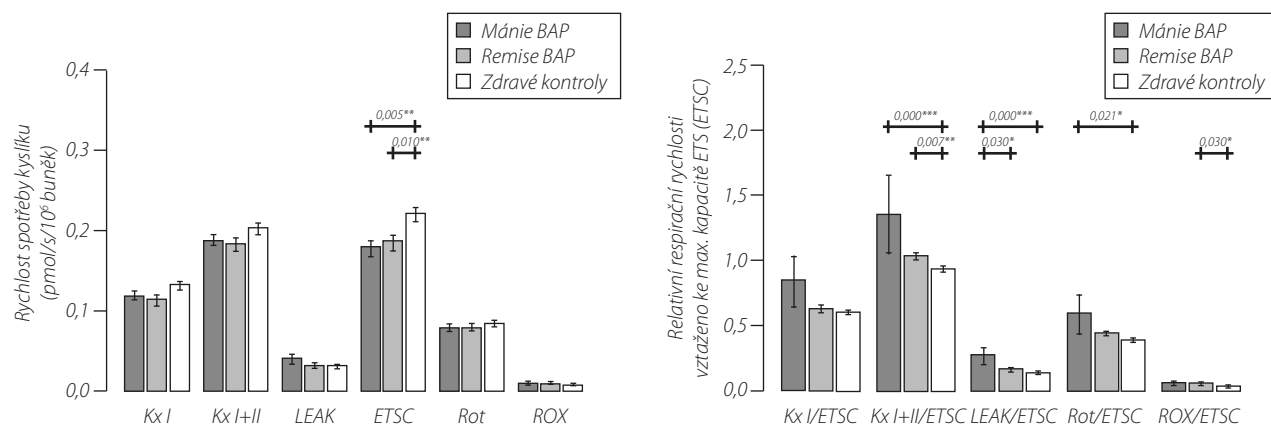
Trombocyty jsou vhodným modelem pro studium mitochondriální respirace v krevních elementech s ohledem na jejich jednoduchou izolaci, která umožňuje *in situ* a *in vitro* měření.^{29,30}

Aktivity komplexů dýchacího řetězce a citrát syntázy

Prokázali jsme sníženou aktivitu CS. V předchozích pracích nebyly zjištěny signifikantní změny v aktivitách enzymů citrátového cyklu (CS, malátdehydrogenáza a sukcinát-dehydrogenáza) v lymfocytech pacientů s BAP.¹⁷ Tato studie byla ale limitována malým počtem pacientů

(18 pacientů), nižším věkem, nízkou mírou expozice medikací, nedávným počátkem onemocnění (méně než 3 roky) a přítomností depresivních epizod všech pacientů s BAP. Změny v aktivitách enzymů citrátového cyklu se u pacientů s nedávným výskytem onemocnění jeví jako kompenzační a preventivní. Pozdější změny v citrátovém cyklu mohou přispět ke změnám v energetickém metabolismu a hrát roli v patofyziologii BAP.¹⁷

Prokázali jsme zvýšenou aktivitu komplexu I a snížení aktivit komplexů II a IV. Tyto výsledky se lišily od výsledků studie, která hodnotila aktivity komplexů ETS v mononukleárních buňkách BAP pacientů a kde nebyly nalezeny signifikantní změny při srovnání s kontrolami.³¹ Studie byla limitována malým počtem pacientů (12 pacientů s BAP) a euthymickým stavem onemocnění. V další studii nebyly nalezeny rozdíly v aktivitě komplexu I, hodnocené



Grafy 3A, 3B. Mitochondriální respirace v permeabilizovaných trombocytech pacientů s BAP v mánii, remisi a zdravých kontrol

Pozn.: Krevní destičky byly permeabilizovány digitoninem. (A) Respirace byla měřena po přidání substrátů komplexu I (malátu, pyruvátu, glutamátu a ADP) (Kx I); poté byl přidán sukcinát jako substrát komplexu II a byla měřena celková respirace (Kx I+II); nefosforylující stav respirace (LEAK) byl navozen oligomycinem; maximální kapacita ETS (ETSC) byla dosažena titrací s rozpřahovačem – FCCP; respirace po inhibici komplexu I (Rot) byla navozena rotenonem; po přidání antimycinu A byla určena zbytková spotřeba kyslíku (ROX). (B) Poměry respiračních rychlostí vztahované k ETSC. Data jsou prezentována jako průměrné hodnoty \pm směrodatná odchylka. Statistická významnost je označena *, kde * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$.

postmortem v mitochondriích prefrontálního kortexu pacientů s BAP a kontrol.³² Zvýšená aktivita komplexu I byla nalezena u pacientů bez medikace; snížená aktivita komplexu I byla nalezena u pacientů s alespoň detekovatelným množstvím psychotropní medikace.³² Tato studie byla limitována tím, že vzorky byly získány pouze z prefrontálního kortexu, jiné části mozku nebyly zkoumány. Neměli bychom opomenout, že podávaná medikace může ovlivnit měřené mitochondriální parametry. Můžeme také zvažovat, že by zvýšená aktivita komplexu I mohla představovat kompenzační mechanismus ke sníženým aktivitám ostatních komplexů. Zvýšená aktivita komplexu I byla zjištěna v trombocytech pacientů s mentální anorexií³³ a pacientů trpících Alzheimerovou nemocí.²²

Respirometrie v trombocytech

Parametry fyziologické respirace (PR), čisté fyziologické respirace (NetPR) a respirace bez fosforylace (LEAK) byly v intaktních trombocytech osob s BAP zvýšeny po normalizaci k ETS kapacitě, zatímco Rot byla snížena (graf 2B). Tento nálezní dobře koresponduje s námi prokázaným zvýšením aktivity komplexu I u pacientů s BAP I (graf 1A). Domníváme se, že zvýšení aktivity komplexu I u pacientů s BAP (v manické fázi i v remisi) může představovat adaptivní mechanismus zodpovědný za zvýšenou fyziologickou mitochondriální respiraci (PR/ETSC) v trombocytech. Za snížení mitochondriální respirace po inhibici komplexu I (Rot/ETSC) je zřejmě odpovědná snížená aktivita komplexu II u pacientů s BAP (graf 2B).

Naše výsledky podporují hypotézu, že aktivita komplexu I koresponduje s variabilitou klinických symptomů u různých psychiatrických a neurodegenerativních onemocnění.^{34,35}

ETSC byla signifikantně snížena v permeabilizovaných trombocytech pacientů s BAP (graf 3A), tj. v situaci s nadbytkem substrátů citrátového cyklu. Pokles ETS kapacity tedy nebyl způsoben nedostatkem substrátů. Toto snížení ETS lze vysvětlit spíše nedostatečnou funkcí enzymů citrátového cyklu a systému OXPHOS. Domníváme se, že zvýšená aktivita komplexu I u pacientů s BAP (graf 1A) představuje kompenzační mechanismus, který zajišťuje nezměněnou ETSC v intaktních trombocytech (graf 2A).

KLADY A ZÁPORY STUDIE

Silnou stránkou studie je originalita výzkumu a design výzkumu. Studie, které byly dosud provedeny a týkaly se výzkumu mitochondriálních funkcí u pacientů s BAP, byly provedeny u pacientů s depresivní fází onemocnění nebo u pacientů v remisi nebo na postmortem vzorcích mozků. Analýza mitochondriálních funkcí u manických fází BAP dosud chybí. Tato studie jako první zkoumá mitochondriální respiraci v trombocytech u pacientů trpících BAP pomocí dobře zavedených metod.

Limitem studie je relativně malý vzorek pacientů a rozdíly ve farmakoterapii. Někteří pacienti byli non-kompliantní a neužívali před přijetím žádnou medikaci. Během hospitalizace bylo podáváno mnoho různých

psychofarmak, což může ovlivňovat měřené parametry. Deset pacientů bylo medikováno valproátem a deset pacientů užívalo lithium. Pacienti s mánií byli léčeni antipsychotiky, benzodiazepiny a hypnotiky. Lithium zvyšovalo aktivitu komplexu I v leukocytech u pacientů s depresivní epizodou BAP po 6 týdnech léčby lithiem, zatímco aktivity ostatních komplexů nebyly ovlivněny;³⁶ aktivity komplexů I–IV nebyly významně změněny u depresivních pacientů s BAP a kontrol.³⁶ Otázkou zůstává, zda zvýšená aktivita komplexu I byla způsobena vlastní nemocí a byla v přímé souvislosti s epizodou BAP, nebo zda byla způsobena lithiem. V našich předchozích *in vitro* studiích nebyla mitochondriální respirace po expozici mitochondrií z prasečích mozků vysokými koncentracemi lithia (2–5 mM) významně ovlivněna.^{37,38} Navíc nebyly nalezeny výrazné změny ve zkoumaných parametrech u pacientů s akutní mánií a u pacientů s remisí (např. nezjistili jsme signifikantní změny v hodnocených parametrech po léčbě). Měřené mitochondriální parametry tak nemohou být využity jako „state markery“ BAP nebo jako markery farmakoterapie, ale mohou být využity jako „trait markery“ BAP.

ZÁVĚR

Změny v aktivitách ETS komplexů a mitochondriální spotřebě kyslíku podporují hypotézu, že narušení bioenergetiky v mitochondriích se může podílet na patofyziologii BAP bez ohledu na fázi onemocnění. Měření v permeabilizovaných trombocytech potvrzují narušení funkce OXPHOS systému u pacientů s BAP. Měření aktivit ETS komplexů a mitochondriální respirace v intaktních trombocytech ukazuje zvýšení podílu komplexu I na produkci buněčné energie, pravděpodobně jako adaptační odpověď na sníženou funkci komplexů II a IV.

Budeme-li předpokládat, že změny mitochondriálních funkcí v trombocytech jsou odrazem změn v mozku, pak naše výsledky podporují hypotézu, že se změny aktivit komplexů ETS podílejí na patofyziologii BAP. Naše výsledky ukazují, že mitochondriální parametry mohou být dále zkoumány jako „trait markery“ BAP. Pro potvrzení tohoto závěru jsou namísto studie zaměřené na výzkum mitochondriálních dysfunkcí v různých fázích BAP.

Seznam zkratk:

BAP – bipolární afektivní porucha

BPRS – stručná psychiatrická hodnoticí škála (Brief Psychiatric Rating Scale)

CGI-S – škála hodnotící celkový klinický dojem, stupeň závažnosti onemocnění (Clinical Global Impression, Severity scale)

CS – citrátsyntáza

ETS – elektronový transportní systém

ETSC – maximální kapacita elektronového transportního systému

LEAK – nefosforylující stav respirace

OXPHOS – oxidativní fosforylace

PR – fyziologická respirace

Rot – respirace po inhibici komplexu I rotenonem

ROX – reziduální spotřeba kyslíku

YMRS – Youngova škála mánie (Young Mania Rating Scale)

LITERATURA

- Malhi GS, Tanious M, Berk M. Mania: diagnosis and treatment recommendations. *Current psychiatry reports* 2012; 14 (6): 676–686.
- Kato T, Kunugi H, Nanko S, Kato N. Mitochondrial DNA polymorphisms in bipolar disorder. *Journal of Affective Disorders* 2001; 62 (3): 151–164.
- Berk M, Kapczinski F, Andreazza AC, Dean OM, Giorlando F, Maes M et al. Pathways underlying neuroprogression in bipolar disorder: focus on inflammation, oxidative stress and neurotrophic factors. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 2011; 35 (3): 804–817.
- Sigitova E, Fisar Z, Hroudova J, Cikankova T, Raboch J. Biological hypotheses and biomarkers of bipolar disorder. *Psychiatry and Clinical Neurosciences* 2017; 71 (2): 77–103.
- Sigitova E, Fisar Z, Hroudová J, Cikanková T, Raboch J. Biological hypotheses and biomarkers of bipolar disorder. *Psychiatry and Clinical Neurosciences* 2017; 71 (2): 77–103.
- Shao L, Martin MV, Watson SJ, Schatzberg A, Akil H, Myers RM et al. Mitochondrial involvement in psychiatric disorders. *Annals of Medicine* 2008; 40 (4): 281–295.
- Rezin GT, Amboni G, Zugno AI, Quevedo J, Streck EL. Mitochondrial dysfunction and psychiatric disorders. *Neurochemical Research* 2009; 34 (6): 1021–1029.
- Jou SH, Chiu NY, Liu CS. Mitochondrial dysfunction and psychiatric disorders. *Chang Gung Medical Journal* 2009; 32 (4): 370–379.
- Schapira AH. Mitochondrial diseases. *Lancet* 2012; 379 (9828): 1825–1834.
- Young LT. Is bipolar disorder a mitochondrial disease? *Journal of Psychiatry & Neuroscience: JPN* 2007; 32 (3): 160–161.
- Clay HB, Sullivan S, Konradi C. Mitochondrial dysfunction and pathology in bipolar disorder and schizophrenia. *International Journal of Developmental Neuroscience: the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience* 2011; 29 (3): 311–324.
- Cikankova T, Sigitova E, Zverova M, Fisar Z, Raboch J, Hroudova J. Mitochondrial dysfunctions in bipolar disorder: effect of the disease and pharmacotherapy. *CNS & Neurological Disorders Drug Targets* 2017; 16 (2): 176–186.
- Stork C, Renshaw PF. Mitochondrial dysfunction in bipolar disorder: evidence from magnetic resonance spectroscopy research. *Molecular Psychiatry* 2005; 10 (10): 900–919.
- Quiroz JA, Gray NA, Kato T, Manji HK. Mitochondrially mediated plasticity in the pathophysiology and treatment of bipolar disorder. *Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 2008; 33 (11): 2551–2565.
- Kato T, Kato N. Mitochondrial dysfunction in bipolar disorder. *Bipolar Disorders* 2000; 2 (3 Pt 1): 180–190.
- Yildiz-Yesiloglu A, Ankerst DP. Neurochemical alterations of the brain in bipolar disorder and their implications for pathophysiology: a systematic review of the in vivo proton magnetic resonance spectroscopy findings. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2006; 30 (6): 969–995.
- de Sousa RT, Streck EL, Forlenza OV, Brunoni AR, Zanetti MV, Ferreira GK et al. Regulation of leukocyte tricarboxylic acid cycle in drug-naïve Bipolar Disorder. *Neuroscience Letters* 2015; 605: 65–68.
- Andreazza AC, Shao L, Wang JF, Young LT. Mitochondrial complex I activity and oxidative damage to mitochondrial proteins in the prefrontal cortex of patients with bipolar disorder. *Archives of General Psychiatry* 2010; 67 (4): 360–368.
- Fox JE, Reynolds CC, Boyles JK. Studying the platelet cytoskeleton in Triton X-100 lysates. *Methods Enzymol* 1992; 215: 42–58.
- Srere PA. Citrate synthase: [EC 4.1.3.7 Citrate oxaloacetate-lyase (CoA acetylating)] *Methods in Enzymology* 1969; 13: 3–11.
- Rustin P, Chretien D, Bourgeron T, Gerard B, Rotig A, Saudubray JM et al. Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies. *Clinica Chimica Acta; international journal of clinical chemistry* 1994; 228 (1): 35–51.
- Fisar Z, Hroudova J, Hansikova H, Spacilova J, Lelkova P, Wenchich L et al. Mitochondrial Respiration in the Platelets of Patients with Alzheimer's Disease. *Current Alzheimer Research* 2016; 13 (8): 930–941.
- Hroudova J, Fisar Z, Kitzlerova E, Zverova M, Raboch J. Mitochondrial respiration in blood platelets of depressive patients. *Mitochondrion* 2013; 13 (6): 795–800.
- Diab YA, Thomas A, Luban NL, Wong EC, Wagner SJ, Levy RJ. Acquired cytochrome C oxidase impairment in apheresis platelets during storage: a possible mechanism for depletion of metabolic adenosine triphosphate. *Transfusion* 2012; 52 (5): 1024–1030.
- Renner K, Amberger A, Konwalinka G, Kofler R, Gnaiger E. Changes of mitochondrial respiration, mitochondrial content and cell size after induction of apoptosis in leukemia cells. *Biochimica et Biophysica Acta* 2003; 1642 (1–2): 115–123.
- Stadlmann S, Renner K, Pollheimer J, Moser PL, Zeimet AG, Offner FA et al. Preserved coupling of oxidative phosphorylation but decreased mitochondrial respiratory capacity in IL-1 β -treated human peritoneal mesothelial cells. *Cell Biochem Biophys* 2006; 44 (2): 179–186.
- Sjovall F, Morota S, Hansson MJ, Friberg H, Gnaiger E, Elmer E. Temporal increase of platelet mitochondrial respiration is negatively associated with clinical outcome in patients with sepsis. *Critical care (London, England)* 2010; 14 (6): R214.
- R Core Team. A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing 2017.
- Sjovall F, Ehinger JK, Marelsson SE, Morota S, Frostner EA, Uchino H et al. Mitochondrial respiration in human viable platelets—methodology and influence of gender, age and storage. *Mitochondrion* 2013; 13 (1): 7–14.
- Wang L, Wu Q, Fan Z, Xie R, Wang Z, Lu Y. Platelet mitochondrial dysfunction and the correlation with human diseases. *Biochemical Society transactions* 2017; 45 (6): 1213–1223.
- Gubert C, Stertz L, Pfaffenseller B, Panizzutti BS, Rezin GT, Massuda R et al. Mitochondrial activity and oxidative stress markers in peripheral blood mononuclear cells of patients with bipolar disorder, schizophrenia, and healthy subjects. *J Psychiatr Res* 2013; 47 (10): 1396–1402.
- Rollins BL, Morgan L, Hjelm BE, Sequeira A, Schatzberg AF, Barchas JD et al. Mitochondrial complex I deficiency in schizophrenia and bipolar disorder and medication influence. *Molecular Neuropsychiatry* 2018; 3 (3): 157–169.
- Bohm M, Papezova H, Hansikova H, Wenchich L, Zeman J. Activities of respiratory chain complexes in isolated platelets in females with anorexia nervosa. *Int J Eat Disord* 2007; 40 (7): 659–663.
- Ben-Shachar D. The interplay between mitochondrial complex I, dopamine and Sp1 in schizophrenia. *J Neural Transm (Vienna)* 2009; 116 (11): 1383–1396.
- Hroudova J, Fisar Z. Connectivity between mitochondrial functions and psychiatric disorders. *Psychiatry and Clinical Neurosciences* 2011; 65 (2): 130–141.
- de Sousa RT, Streck EL, Zanetti MV, Ferreira GK, Diniz BS, Brunoni AR et al. Lithium increases leukocyte mitochondrial complex I activity in bipolar

- disorder during depressive episodes. Psychopharmacology 2014.
37. Hroudova J, Fisar Z. Activities of respiratory chain complexes and citrate synthase influenced by pharmacologically different antidepressants and mood stabilizers. Neuroendocrinology Letters 2010; 31 (3): 336–342.
38. Hroudova J, Fisar Z. In vitro inhibition of mitochondrial respiratory rate by antidepressants. Toxicology Letters 2012; 213 (3): 345–352.
39. Overall JE, Gorham DR. The brief psychiatric rating scale. Psychol Rep 1962; 10: 799–812.
40. Guy W. Clinical Global Impressions (CGI) Scale, Modified. In Rush, John A. Task Force for the Handbook of Psychiatric Measures. Handbook of Psychiatric Measures (1st ed.). Washington D.C., American Psychiatric Association 2000.
41. Lukasiewicz M, Gerard S, Besnard A, Falissard B, Perrin E, Sapin H et al. Young Mania Rating Scale: how to interpret the numbers? Determination of a severity threshold and of the minimal clinically significant difference in the EMBLEM cohort. Int J Methods Psychiatr Res 2013; 22 (1): 46–58.

referáty z literatury

Cross AJ, Anthenelli R, Li X Metabotropic glutamate receptors 2 and 3 as targets for treating nicotine addiction

(Metabotropní glutamátové receptory 2 a 3 jako cíle pro léčbu závislosti na nikotinu)
Biol Psychiatry 2018; 83 (11): 947–954

Kouření tabáku, poháněné závislostními vlastnostmi nikotinu, pokračuje coby celosvětový zdravotní problém. Založeny na dobře zavedené roli glutamátového nervového přenosu u lékové závislosti, snaží se nové strategie vývoje léků zastavit spotřebu nikotinu a předejít recidivě kouření tabáku modulací přenosu glutamátu. Presynaptické inhibiční metabotropní glutamátové receptory 2 a 3 (mGluR2/3) jsou klíčové autoreceptory na glutamátergních zakončeních v mozku, jež udržují homeostázu glutamátu. Hromadící se důkazy naznačují rostoucí roli mGluR2/3 v různých aspektech závislosti na nikotinu. Zahrnutí mGluR2/3 do jiných nervově-psychiatrických stavů, jako jsou úzkost, deprese, schizofrenie, Alzheimerova choroba, Parkinsonova choroba a bolest, poskytuje přesvědčivé důkazy naznačující, že mGluR2/3 jsou účinným léčebným přístupem pro souběh kouření a uvedených stavů.

Tento cílený přehledový článek amerických autorů z univerzitních pracovišť v Cambridge (MA) a La Jolla (CA) zdůrazňuje, že mGluR2/3 poskytují slibný cíl při hledání léků pro přerušování kouření s novými mechanismy účinků, které se liší od léčebných nyní schválených americkým Úřadem pro kontrolu léků a potravin (FDA).

Liao P-J, Lin T-Y, Ting M-K et al. Chest width, waist circumference, and thigh circumference are predictors of dementia

(Šířka hrudníku, obvod pasu a stehna jsou prediktory demence)
International Journal of Geriatric Psychiatry 2018; 33 (8): 1019–1027

Několik studií zkoumalo vztah mezi specifickými tělesnými rozměry a demencí. Trojrozměrná antropometrická data z měření povrchu těla, obsahující 38 tělesných rozměrů, byla sbírána od 6831 účastníků z jednoho tchajwanského lékařského centra během let 2000–2008. Během desetiletého sledování bylo zjištěno 236 případů demence. Ze statistických metod byla provedena mnohonásobná regresivní analýza podle Coxova.

Specifické tělesné míry, totiž šířka hrudníku (HR = 0,90, 95%CI = 0,83–0,98) a obvod pravého stehna (HR = 0,93, 95%CI = 0,90–0,96), byly ochrannými prediktory výskytu demence. Obvod pasu (HR = 1,03, 95%CI = 1,02–1,05) byl rizikovým faktorem při výskytu demence. Mezi kombinacemi bylo vyšší riziko demence u účastníků s větším obvodem pasu a menším obvodem pravého stehna s nejvyšším HR = 2,49 (95%CI = 1,54–4,07).

Tchajwanští autoři z různých univerzitních pracovišť (New Taipei City, Taoyuan a Keelung) uzavírají, že tělesné míry poskytují klíče pro budoucí použití jak v klinickém, tak v preventivním lékařství.

MUDr. Jaroslav Veselý