



## 2. LÉKAŘSKÁ FAKULTA UNIVERZITA KARLOVA

Ústav fyziologie  
2. lékařské fakulty Univerzity Karlovy

V Praze, 3.9.2022

Oponentský posudek disertační práce Mgr. Ingrid Vargové na téma

### **Study of mechanisms influencing inflammatory and neurodegenerative processes and their subsequent treatment in models of ALS and spinal cord injury**

#### **Cíle disertační práce, výsledky a aktuálnost zvoleného tématu**

Ve své práci se Mgr. Vargová soustředí na molekulární a buněčné mechanismy, které jsou odpovědné za zánětlivé pochody a neurodegeneraci v patogenezi amyotrofické laterální sklerózy (ALS) a poranění míchy. Jedná se o vědecky i klinicky významná témata, která jsou zaměřena na příčiny a mechanismy vzniku těchto závažných neurologických onemocnění. Z důvodů absence poznatků o příčinách a patologických procesech nedisponuje současná medicína účinnou léčbou, která by zvrátila negativní průběh těchto nemocí.

Již na začátku oponentského posudku je nezbytné zmínit, že se jedná o velmi kvalitní disertační práci, která je po všech stránkách velmi dobře zpracovaná a čtivá. Úvod práce obsahuje přehled studované problematiky a jednotlivé kapitoly na sebe dobře navazují. Autorka se zpočátku věnuje popisu vybraných neurodegenerativních procesů, které jsou důležité v patogenezi celé řady neurologických onemocnění. Velký důraz je kladen na současné znalosti o procesu autofagie a stresu endoplazmatického retikula, neboť se jedná o děje, které jsou středem zájmu vědecko-výzkumné činnosti Mgr. Vargové. Jedná se o procesy, které zahrnují složité a vzájemně propojené intracelulární a extracelulární signální kaskády, kde nezastupitelnou úlohu hraje mTOR signální kaskáda. Tyto kapitoly jsou následované popisem současných znalostí o mechanismech ALS a míšního poranění. Zde se autorka věnuje především popisu úlohy autofagie, stresu endoplazmatického retikula a mTOR signalizace. Přehled současných znalostí a nalezení chybějící informací vedlo ke stanovení čtyř základních hypotéz a cílů, které představují hlavní pilíře disertační práce. Hypotézy, cíle práce a plánované experimenty jsou jasně definovány.

Popis použitých metodik a modelů studovaných onemocnění je velmi dobře dokumentován. Metodika využívá komplexní přístupy k nalezení odpovědí na stanovené výzkumné otázky a hypotézy. Autorka účinně kombinuje funkční metody s metodami morfologickými, imunohistochemickými, či molekulárně genetickými. Pokusy zahrnují jak *in vitro* metody, tak *in vivo* studie, a výsledky tudíž mají nejenom vědecký, ale také vysoký translační potenciál. Ke zpracování a kvantifikaci získaných funkčních i obrazových dat autorka používá pokročilých analýz. Výsledky jsou zpracovány adekvátními statistickými metodami a prezentovány numericky v textu, ale také formou přehledných grafů, obrázků či tabulek.

Výsledky jsou členěny do oddílů dle stanovených čtyř základních hypotéz. V první skupině experimentů autorka studovala vliv inhibice mTOR signální kaskády na strukturu a funkci míchy po jejím poranění. Za tímto účelem použila blokátor mTORC1 rapamycin, ale také látku pp242, která inhibuje nejen mTORC1, ale také mTORC2 aktivitu. Cestou duální inhibice se předpokládalo významnější ovlivnění mTOR signalizace. Při hodnocení účinku se autorka zaměřila nejen na morfologické a funkční změny, ale především sledovala změny v zánětlivé reakci na poranění a autofagii. Výsledky prokázaly, že autofagie je zvýšená u míšního poranění a obě použítá rapaloga autofagii významně zvýšila. Léčba rapalogy také ovlivnila vybrané ukazatele zánětu v samotné tkáni a séru. Avšak porovnání mezi použitými rapalogy byla poměrně diskordantní a nelze jasně posoudit význam v ovlivnění zánětlivé reakce. Léčba použitými rapalogy však měla významný vliv na strukturální a funkční změny, kdy po podání látek byla velikost míšního léze menší a lokomoční aktivita, resp. hybnost zadních končetin, se zvýšila.

Ve druhé skupině experimentů se autorka podílela na studiu vlivu opakované aplikace mesenchymálních kmenových buněk do míchy či svalu na progresi ALS ve zvířecím modelu. Mgr. Vargová se zde primárně zaměřila na význam autofagie v progresi onemocnění a na protektivní, resp. regenerační vliv léčby kmenovými buňkami. Výsledky prokázaly, že aplikace kmenových buněk zpomalila progresi onemocnění. Efekt léčby se projevil na době přežívání zvířat, ale také na úrovni přežívání motoneuronů v míše, které bylo hodnoceno na základě počtu neuronů a přítomnosti neuromuskulárních spojení ve svalech. Největší účinek byl pozorován v případě podání simultánního podání léčby intratekálně a intramuskulárně. Léčba také ovlivnila procesy autofagie, resp. jejich ukazatelů. Avšak interpretace významu pozorovaných změn v kontextu stanovené hypotézy je obtížná

Třetí skupina experimentů se zaměřila na úlohu proteinu PHLDA3. V literatuře byla popsána zvýšená tvorba tohoto proteinu v astrocytech u ALS. Cílem experimentu bylo ozřejmit, jaký vliv má produkce tohoto proteinu na přežívání astrocytů, ale také na oxidativní stress a stres endoplazmatického retikula. Výsledky prokázaly, že tento protein nemá cytotoxický efekt na astrocyty, ale jeho zvýšená produkce je doprovázena stresem endoplazmatického retikula astrocytů. Jako elegantní považuji experimenty, které testovaly vliv tohoto proteinu na motoneurony v kulturách motoneuronů, na které bylo přeneseno médium z kultur astrocytů. Astrocytární médium mělo selektivní cytotoxický efekt na motoneurony, ale ne na ostatní neurony.

Poslední experiment byl zaměřen na metodiku vytvoření kultury míšních neuronů, které budou zahrnovat interneurony. Molekulární, strukturální a funkční vlastnosti těchto kultur byly velmi detailně studovány ve specifických časových obdobích. Cílem bylo nalezení časového období, kdy výše uvedené vlastnosti neuronální kultury a nervových buněk měly charakter zralých neuronů. Jedná se o hlavní část výzkumu autorky. Získaná pozorování a nová metodika otevírají možnosti pro využití této techniky ke studiu složité povahy patofyziologických procesů, které se podílí na řadě onemocnění míchy.

### **Výsledky disertační práce a její přínos pro další rozvoj vědy**

Předložená disertační práce je velmi kvalitní a splňuje předpoklady pro úspěšné naplnění podmínek samostatné tvůrčí vědecké práce. Jedná se o multioborovou práci s vysokým translačním potenciálem do klinické praxe. Získané výsledky byly publikovány v mezinárodních časopisech s impaktovým faktorem, kde figuruje Mgr. Vargová jako hlavní autorka, či spoluautorka. Vědecko-výzkumná činnost Mgr. Vargové přináší nové poznatky o

úloze autofagie, oxidativního stresu, či stresu endoplazmatického retikula ve vybraných onemocněních míchy a v neurodegeneraci. Dále přináší nové poznatky o úloze mTOR signalizace u těchto onemocnění, jaké patologické procesy tato signální kaskáda ovlivňuje a jak je možné modifikaci mTOR signální kaskády využít v léčbě těchto onemocnění. Práce také vedla k vývoji nové metody kultivace míšních interneuronů, jež umožňuje detailnější výzkum mechanismů onemocnění míchy. Předložená disertační práce svědčí o širokém rozhledu autorky a znalosti celého spektra experimentálních technik od buněčných kultur, přes behaviorální testování, histologické techniky, molekulárně biologické metody až po proteomiku.

### Připomínky k formální stránce práce

Disertační práce splňuje veškeré formální aspekty. Obsahuje celkem 128 stran. Práce je napsána velmi čtivě a odborně v anglickém jazyce s minimem překlepů a gramatických chyb. Je na místě velmi ocenit konciznost disertační práce, která nezabíhá do zbytečných detailů a zaměřuje se především na aspekty podstatné pro studovanou problematiku. Také je zapotřebí ocenit grafickou stránku práce, kdy kromě výsledků je práce doplněna i o názorná a graficky zdařilá schémata, které autorka sama vytvořila. Množství použitých citací svědčí o důsledné práci autorky s odbornou literaturou. Práce obsahuje seznam použité literatury, seznam zkratk a vlastních publikací autorky.

### Témata pro diskusi při obhajobě disertační práce

1. Jaké jsou v současnosti možnosti vytváření neuronálních kultur obsahující interneurony, např. kultury modelující neokortex? Existují postupy, jak lze ovlivnit poměr mezi hlavními neurony a interneurony.
2. Lze vytvářet kultury, ve kterých jsou zastoupeny veškeré podtypy interneuronů společně, např. parvalbuminové, somatostatinové, VIP neurony apod.?
3. Funkční charakterizace neuronů v kulturách zahrnovala pouze intrinsické vlastnosti neuronů a jejich schopnost generovat akční potenciály. Byla v rámci experimentů provedena měření přímo ze samotných v interneuronů? Shoduje se spontánní a evokovaná aktivita zralých interneuronů v kultuře s aktivitou spinálních interneuronů v *in vitro* řezech?
4. V současnosti je dobře zdokumentováno, že synaptická aktivita nezralých korových interneuronů není inhibiční. Naopak GABAergní synaptická aktivita má excitační účinek v důsledku odlišné exprese přenašečů pro chloridové anionty a odlišné intracelulární koncentrace chloridů. Byly provedeny podobné studie v případě nezralých míšních interneuronů? Proč autorka v rámci svých experimentů necharakterizovala synaptickou aktivitu interneuronů v kultuře?
5. Jako velmi zajímavé nacházím experimenty zaměřené na úlohu proteinu PHLDA3. Z jakého důvodu astrocytární médium selektivně způsobuje zánik motoneuronů? Aplikovala autorka toto médium také na interneuronální kultury?
6. Je možné analyzovat složení astrocytárního média a určit klíčové látky, které mají cytotoxický účinek na motoneurony?

## **Závěr**

Na základě rozboru disertační práce, její vědecké úrovně, původnosti a řešení konstatuji, že Mgr. Ingrid Vargová prokázala vysoké tvůrčí vědecké schopnosti a předložená práce splňuje požadavky kladené na práce tohoto typu ve smyslu §47 VŠ zákona 111/98 Sb. Navrhuji komisi pro obhajoby kandidátských disertací, aby předloženou práci posoudila kladně a uchazečce udělila titul „Ph.D.“.

prof. MUDr. Přemysl Jiruška, Ph.D.