



Oponentský posudek na dizertační práci Mgr. Ingrid Vargové

Studium mechanismů ovlivňujících zánětlivé a neurodegenerativní procesy a jejich následná léčba na modelech ALS a míšního poranění.

Dizertační práce Mgr. Vargové si klade za cíl analýzu mechanismů intracelulární degenerace, ke kterým dochází během patologických procesů spojených s míšními poraněními a s patogenezí amyotrofické laterální sklerózy (ALS); a dále studium mechanismů neuroregenerace, které jsou navozeny léčbou míšních poranění a ALS. Zvláštní důraz je kladen na analýzu role autofagie a stresu endoplazmatického retikula (ER) a na signální dráhu PI3K-AKT-mTOR, která tyto procesy reguluje.

Práce se zabývá velmi významným tématem regenerace míšních poranění a patogeneze ALS a je vypracována v laboratoři, která má s danou problematikou dlouhodobě zabývá. Práce je klasicky členěna na sekce úvod, cíle a hypotézy, metody, výsledky, diskuze, závěr, shrnutí a literaturu.

Úvod velmi pěkně představuje problematiku míšních poranění, ALS i buněčných procesů a molekulárních mechanismů, které ovlivňují jejich průběh – obzvláště autofagii, stres ER a mTOR signální dráha. Úvod je doplněn velmi přehlednými originálními schématy, která usnadňují pochopení jednotlivých mechanismů.

Cíle a hypotézy detailně a přehledně shrnují cíle, jež si autorka vytyčila. Práce si klade 4 hlavní cíle:

1. Působení inhibitorů dráhy mTOR - rapamycinu nebo pp242 na akutní míšní poškození.
2. Vliv opakované intratekální a intramuskulární aplikace mesenchymálních kmenových buněk na potkaní model ALS SOD1^{G93A}
3. Studium účinku nadexprese PHLDA3 v astrocytech.
4. Vytvoření robustního *in vitro* modelu míšních interneuronů.

Metody popisují informace nutné pro pochopení provedených experimentů a pro posouzení modelových systémů. Vzhledem k tomu, že autorka používala transfekce různých konstruktů do buněčných kultur, bylo by vhodné do této sekce vložit i kapitoly charakterizující tyto konstrukty, což by v některých případech usnadnilo pochopení provedených experimentů.

Výsledky jsou také dobře strukturované a doprovázené obrázky s adekvátními popisky. Ocenil bych detailnější popis experimentů v této sekci, aby nebylo nutné pro pochopení experimentů přeskokovat do sekce Materiál a metody, kde však důležité informace uvedeny jsou.

Diskuse dává získané výsledky velmi pěkně do kontextu s již publikovanými daty a celkově jsou výsledky shrnuty v sekcích Závěr a Shrnutí.

K prezentovaným výsledkům mám několik dotazů:

1. Počátek a délka aplikace rapamycinu či pp242 po SCI má jistě významný vliv na jejich výsledný efekt, byla testována i dlouhodobější aplikace těchto látek než podání 5-ti dávek v rozmezí 2 - 7 dnů po poranění? Byla na řezech v té době testován vliv rapamycinu či pp242 i na apoptózu v okolí místa poranění (tunel assay, caspase 3)?
2. Aplikace rapamycinu a pp242 vede k významnému snížení počtu p-S6-pozitivních buněk v míše po poranění (obr. 7G-J). Jaké je množství p-S6-pozitivních buněk v míše bez poranění, a vede aplikace rapamycinu, či pp242 ke snížení až k tomuto počtu? Jaký je počet LC3b-pozitivních buněk u mých bez poranění (obr. 8G)?
3. RAPA i pp242 podporuje u mých po poranění růst nových axonů pozitivních na GAP43+ (obr. 11). Je distribuce těchto nově rostoucích axonů rovnoměrně rozptýlená po míše, nebo je v blízkosti míšního léze počet GAP43+ pozitivních axonů vyšší než v oblastech dále od léze? Vede aplikace RAPA či pp242 k indukci růstu axonů (GAP43+) i u kontrolních myší bez míšního poranění?
4. Jak dlouho přežívají lidské mezenchymální kmenové buňky (hMSC) po injekci do imunosuprimovaných potkanů? Nebylo by vhodnější používat potkaní allo- než lidské xenografty MSC?
5. Byl pro PHLDA3 expresi v astrocytech (obr. 16) použit fúzní konstrukt s GFP? Pokud ano, neměl by mít tento exogenní PHLDA3-GFP protein významně vyšší molekulární hmotnost na Western blotu (obr. 16B, dráha 3) než endogenní PHLDA3 detekovaný v prvních dvou drahách?
6. Indukuje PHLDA3-GFP-temperované médium apoptózu kultivovaných motoneuronů?

Celkově se jedná o podařenou dizertační práci, která je pečlivě vypracovaná a velmi pěkně napsaná v anglickém jazyce. Pochválil bych originální schémata začleněná do úvodu i velmi malé množství chyb a překlepů. Výsledky dizertační práce Mgr. Vargové byly publikovány ve 3 publikacích: 2 z nich jsou prvoautorské publikace v *Biomedicines* (IF 5,6) a *Front Cell Neurosci* (IF 5,5) a 1 je spoluautorská ve *Stem Cells Transl Med* (IF 6,4). Bohužel autorka blíže nekonkretizuje svoji úlohu v těchto publikacích, což by ale měla učinit během obhajoby dizertační práce. Je také škoda, že publikace nepřiložila k dizertační práci, což by usnadnilo jejich posouzení recenzenty. Přes tyto drobné nedostatky doporučuji práci přijmout, jako práci dizertační a udělit studentce akademický titul Ph.D.

V Praze dne 5. 9. 2022

Martin Balšítk, Ph.D.