

OPONENTSKÝ POSUDEK

na disertační práci postgraduálního doktorského studia v oboru

„ANATOMIE, HISTOLOGIE A EMBRYOLOGIE“

„MORFOLOGICKÁ CHARAKTERISTIKA ZMĚN VE STRIATU PŘI NEURODEGENERATIVNÍM PROCESU V MOZKU“

Mgr. Ivany Gunčové

Předložená disertační práce završuje doktorandský pobyt autorky na Ústavu histologie a embryologie LF UK v Hradci Králové a shrnuje na 148 stranách s 59 obrazovými tabulemi a 7 grafy (22 stran zaujímá 337 literárních citací) výsledky vědecko výzkumné práce na zajímavé problematice neurodegenerativních procesů (NDP) v oblasti bazálních ganglií telencefala. Výzkumná tématica byla řešena v rámci interdisciplinární spolupráce s Neurochirurgickou klinikou FN, Ústavu farmakologie a Ústavu fyziologie LF UK v Hradci Králové za finanční podpory Výzkumného záměru MSM0021620820, grantu GAUK 44609/2009/C, interního grantu LF HK a firmy ROCHE. Současně musím zdůraznit, že studijní kariéra autorky byla významně formována a zaštitěna nejen vědecko pedagogickou orientací školitelky na neurohistologii, ale že i laboratorní zázemí a metodicko technická zdatnost a způsobilost kmenového pracoviště v problematice této náročné oblasti poskytly vhodné zázemí pro úspěšné řešení proponovaných cílů.

Na základě uvedených skutečností mohu konstatovat, že Mgr. Ivana Gunčová měla všechny předpoklady pro efektivní zvládnutí a úspěšnou realizaci záměrů disertační práce. Také přímá vazba na řešení vědecko výzkumných úkolů s analogickou problematikou byla jistě přínosem pro odborný růst a získávání vlastních laboratorních zkušeností. To je ostatně nezastupitelnou složkou, požadovanou v postgraduální vědecké přípravě doktorandů, aby byli systematicky připravováni k úspěšnému vedení pracovního týmu. Díky značně široké paletě metodických a technických postupů v řešení disertační práce i díky vyzrálému kolektivu i zásadám, uplatňovaným vedením ústavu, mohu konstatovat, že tato podmínka vědecké přípravy byla do důsledků uplatněna. Samozřejmě to platí nejen o základní odběrové technice, zpracování materiálu, ale i o zvládnutí metodiky imunohistochemických reakcí a postupů transmisní světelné i fluorescenční mikroskopie, samozřejmě včetně vyhodnocování obrazové analýzy.

Práce je uvedena seznamem zkratk použitých v textu, což bezesporu přínosem pro orientaci čtenáře, který se neorientuje v terminologii specializovaného oboru morfologie. Za

ním následuje kapitola „*Úvod do problematiky*“, v němž odbornou vyzrálост autorky dokládá volba a uspořádání současného stavu poznatků, kde se věnovala cílevědomému uspořádání literárních poznatků podle plánovaného rozvržení základních cílů disertační práce a v připojených citacích se propracovala až k roku 2011. Jak jsem již uvedl, seznam literatury dosahuje úctyhodného čísla 337 dat. Mohu konstatovat, že se také úspěšně vyrovnala se současným trendem zaměření základního i aplikovaného výzkumu na interdisciplinární chápání vědeckých problémů, a to prakticky až po úroveň molekulárně biologické interpretace procesů na úrovni neuronů a gliové linie oblasti bazálních ganglií. Logickým shrnutím této části jsou „*Cíle studie*“, které orientují bádání na sledování komplexních změn za fyziologických podmínek i patomorfologických stavů, které provázejí dvě tradiční modelové situace pro Huntingtonovu choreu – HCH - (po neurotoxické lézi; transgenní jedinci) ve striatu laboratorního potkana. Je třeba vyzvednout, že autorka upozorňuje a má stále na zřeteli kritické hodnocení mezidruhových rozdílů i obtížnost zjednodušeného přenášení závěrů na situaci u člověka.

Kapitola „*Materiál a metody*“ podává vcelku zasvěcený a podrobný přehled použitých postupů, a to od předoperační přípravy, stereotaktické aplikace kyseliny chinolové, i.p. medikace deoxyuridinu a erythropoetinu, včetně časování. Zachycuje unifikovaný postu odběru vzorků z mozku po otevření lební dutiny přes metodiku perfusní a imersní fixace až po přípravu řezů v parafinové a kryostatové technice.

Dovolil bych si však poznámku k diskusi o zpracování parafinových řezů, která je možná poněkud kacířská v kontextu řady laboratorních příruček: Tedy především pokud definujeme zpracování jako deparafinaci, vlastní metodu a montování řezů, pak definice deparafinace je převedení parafinového řezu do vody a není tedy třeba ono zavodnění přes etanol samostatně popisovat (objeví se ve skladbě sady). Za podstatnější však považuji to, že použití sestupné i vzestupně alkoholové řady na řezy je až na vzácné výjimky nadbytečné, neboť význam tohoto postupu je zřejmý u objemnějšího vzorku v jeho 3D charakteristice a její významnější retrakci zvláště při dehydrataci. U řezu, jehož tloušťka kolem 10 μm , který je nalepen na podložním skle je 3D deformace prakticky zanedbatelná.

Velmi oceňuji úplný přehled mono- a polyklonálních primárních i sekundárních protilátek, včetně jejich původu a dodavatele, dále pak aplikaci Western blotové techniky pro semikvantitativní analýzu obsahu GFAP zvláště pro objektivizaci hodnocení účinku erythropoetinu na oblast striata i stanovení mitochondriové respirace. Trochu rozpaků mi působí stereologická metoda s využitím testovací sítě, což byla dříve prakticky jediná

použitelná kvantifikační metoda pro histologické preparáty a elektronogramy, a to zvláště tedy na submikroskopické úrovni.

Mám proto asi spíše otázku, zda by nebylo vhodnější a možná i méně pracné použít metodu počítačové obrazové analýzy, a to zvláště v kombinaci s konfokální mikroskopií, kde by dostatečná tloušťka řezu (kolem 100 μm) umožnila simultánní vyhodnocování *in situ* v 3D podmínkách. Tento přístup by podle mého názoru jednoznačněji kvantifikoval přesuny GFAP v astrocytové populaci obecně, a v jednotlivých astrocytech zvláště, při neurodegenerativních procesech ve striatu.

Kapitola „*Výsledky*“ poskytuje širokou paletu nálezů, a to od makroskopických (spojených s významnou redukcí objemu striata a s dilatací korespondující postranní komory, až po subcelulární identifikaci cytoskeletových komponent). Z textu vyplývá charakteristický obraz rozvoje NDP při neurotoxické lézi, a to od její akutní až po chronickou fázi těchto dějů. Oceňuji komplexní přístup ke sledování faktorů, počínaje iniciální zánětlivou reakcí v postoperačním období, jež díky utilizaci bromdeoxyuridinu značkuje buňky aktivované mikroglie a makrofágy, ať již s pozitivitou PCNA či AIF1 markeru, a časově i lokalizačně expresivními nálezy reaktivace astrocytové populace. Ty jsou dokumentovány průkazem nestinu, vimentinu a jejich vztahy k GFAP až po kolokalizaci v centru aplikace linolové kyseliny kolem vpichového kanálu až po periferii striata, kde je jistě zajímavým nálezem stimulace syntézy nestinových či vimentinových intermediárních (tento termín preferuji v porovnání s „intermediálních“) filament v endotelových buňkách kapilár. Také v této souvislosti nerozumím termínu „i v periferních částech striga (str. 42, poslední řádek)“ a spíše bych chápal, že jde o striatum a nikoliv bájnou nestvůru. Důležitou vypovídací hodnotu a časování výskytu lze přičíst sledování proteinu S100 β , který díky své vazebné kapacitě ke kalciovým kationtům dokáže v určité hladině vykazovat neurotrofní efekt, ale při přehnané expresi naopak být jedním z faktorů ovlivňujících vstup buněk do apoptosy. Ostatně to může být jedním z vysvětlení k iniciálnímu vzestupu a poté úbytku S100 β pozitivních astrocytů v porovnání s kontrolními vzorky s odstupem od zahájení NDP. Také vymizení koexprese tohoto proteinu, jakož i vimentinu, s GFAP spolu s deplecí proliferující populace gliových buněk a tvorbou GFAP pozitivní perivaskulární gliové membrány charakterizují spolu se známkami demyelinizace přechod do chronické fáze. Tyto nálezy do značné míry korespondují i se změnami u senilních jedinců. Zajímavé je pozorování proliferace oligodendrocytů, a to především v regionech demyelinizovaných, přičemž však to nejsou buňky, které by se přímovpodílely na tvorbě nových myelinových pochev, tedy na reparaci

maelinizace. Samozřejmě také prořídnutí neuropilu dokládá redukci synaptických kontaktů jako následek redukce neuronů. Možná by bylo přínosné zařadit do sledování i hodnocení incidence apoptotických procesů ve striatu sledovaných zvířat, a to možná při cíleném zaměření na cytoskeletové komponenty (např. metodou průkazu štěpení cytrokeratinu 18 - M30 CytoDeath - nebo průkazem aktivované kaspázy 3). Jaké má autorka o těchto dějích informace?

Druhá modelová situace se týká nálezů u transgenních potkanů pro HCH, kde se známky NDP objevují asi od 6. měsíce, ale zřetelný obraz selektivní degenerace striatových neuronů nastupuje v době od 18 měsíců do 2 let, kdy je již vyjádřena pokročilá atrofie striata. Na rozdíl od neurotoxického poškození není v tomto případě podle autorky vyjádřena reaktivace astrocytů ve smyslu exprese nestinu a vimentinu, nýbrž se jedná spíše o GFAP pozitivní astrocyty diferencované z tzv. klidových prekurzorů a nikoliv reaktivací existující populace. Tuto hypotézu podporují i nálezy použitých proliferačních a diferenciačních markerů. Důležitým průvodním znakem nálezů u HCH i transgenních zvířat je výskyt polyglutaminových intranukleárních inkluzí, vázaný na mnohonásobně opakované CAG triplety v genu pro mutovaný huntingtin. Škoda, že tato partie nálezů nebyla alespoň zčásti prezentována na submikroskopické úrovni, protože často akumulace uniformního typu proteinu vykazuje z hlediska struktury až parakrystalické uspořádání.

Vyzvednout je třeba doplnění palety metodického přístupu pro komplexní sledování NDP o ověření respirační aktivity mitochondrií, jakož i klinické sledování behaviorálním testem motoriky experimentálního potkana. K tomu je třeba dodat, že v práci byly ověřovány též možné terapeutické účinky erythropoetinu na neurotoxické poškození, ale jeho receptorově mediováný vliv na cytodiferenciaci se uplatnil v podstatě pouze v akutní fázi procesu, tedy jeho prakticky neefektivní použití u chronického stadia, jakož i u humánní formy HCH. Autorka však upozorňuje na zajímavý výsledek možného vyvolání druhé vlny proliferace gliových elementů v subchronické fázi NDP po neurotoxikém působení chinolové kyseliny. Získané nálezy pak jsou v disertační práci kriticky zpracovány v kapitole „*Diskuse*“ takovým způsobem, že spolu s formulovanými „*Závěry*“ dokumentují vědeckou vyzrálou autorku a dávají oprávněné předpoklady k dalšímu rozvoji odborného profilu.

Práce působí celkově uceleným dojmem, je napsána dobře srozumitelným slohem, má příkladné logické členění a didakticky rozvíjí základní směry proponovaných cílů. Orientace v metodické paletě provedení imunoreakcí i dokumentace výsledků je na velmi dobré úrovni a splňuje požadavky kladené na závěrečnou práci doktorského studijního programu. Na základě posouzení vstupních údajů, materiálu disertační práce i dalších prezentací na

odborných jednáních mohu konstatovat, že Mgr. Ivana Gunčová prokázala zvládnutí samostatné vědecko-výzkumné práce i řady náročných laboratorních postupů. Svědčí o tom nejen aktuální a moderní tematika, ale také praktické uplatnění techniky imunohistochemie s enzymovým i fluorochromovým značením protilátek i využití Western blotové techniky k semikvantitativnímu hodnocení. Po zvážení všech aspektů činnosti a pozitivních vystoupení na domácích i zahraničních odborných sjezdech a 8 odborných publikací v recenzovaných časopisech IF, z nichž u jedné je první autorkou, mohu konstatovat, že práce splňuje požadavky dané zákonnými předpisy a normami.

Proto podle § 47 VŠ zákona 111/98 doporučuji, aby disertační práce byla předložena k obhajobě a po úspěšném obhájení se stala podkladem pro pokračování řízení k udělení akademického titulu PhD za jménem.

V Praze, dne 31. srpna 2011

Prof. MUDr. Jindřich Martínek DrSc.