

OPONENTSKÝ POSUDEK DIZERTAČNÍ PRÁCE

Název: Morfologická charakteristika změn ve striatu při neurodegenerativním procesu v mozku

Autor: Mgr. Ivana Gunčová

Oponent: Ing. Miroslava Anděrová, CSc

Podkladem předkládané dizertační práce, která se zabývá morfologickou charakteristikou změn striata v průběhu Huntingtonovy choroby (HD) a možnostmi jeho ovlivnění, jsou výsledky vědecké činnosti Mgr. Ivany Gunčové, získané během postgraduálního studia pod vedením Doc. MUDr. Yvony Mazurové, CSc. Dizertační práce zahrnuje výsledky publikované v impaktovaných časopisech, souhrnný IF všech publikací autora je vynikající – 14.25. Výsledky dizertační práce Mgr. Ivany Gunčové významně přispívají k porozumění mechanismů progresu HD a současně i k objasnění podílu gliových buněk, především astrocytů, na neurodegenerativním procesu. Vzhledem k tomu, že incidence neurodegenerativních onemocnění je v celosvětovém měřítku obecně stoupající a jejich účinná léčba je zatím nedostupná, zvolené téma dizertační práce je velmi aktuální. Objasnění morfologických změn mozku v progresi HD je jedním ze základních, a tedy velmi významných, kroků k pochopení patofyziologie HD.

Dizertační práce obsahuje 148 stran, z toho 29 stran tvoří literární úvod, ve kterém autorka velmi přehledně sumarizuje informace týkající se jak onemocnění bazálních ganglií obecně, tak i Huntingtonovy choroby. Dále se zaměřuje na potenciální úlohu gliových buněk v progresi Huntingtonovy choroby a přehled používaných modelů, které toto neurodegenerativní onemocnění simulují. Z přehledu je patrné, že autorka má v dané oblasti velmi dobré znalosti a dokáže zdůraznit informace relevantní pro vlastní práci. Práce je napsána srozumitelně a kultivovaným jazykem. Literární úvod je založen na starších, ale i nejnovějších poznatcích v oboru.

Cíle práce jsou stanoveny konkrétně a přehledně. V metodické části (10 stran) autorka podrobně a přehledně popisuje indukci neurotoxické léze, původ transgenních potkanů, přípravu a barvení tkáňových řezů, behaviorální testování pokusných zvířat, Western blot analýzu, zpracování/analýzu digitalizovaného obrazu a v neposlední řadě i sledování mitochondriální respirace. Z přehledu použitých metod je zřejmé, že autorka zvládla řadu náročných technik v průběhu postgraduálního studia, včetně jejich vyhodnocování. Použité metody jsou adekvátní stanoveným cílům dizertační práce.

Výsledky (65 stran) jsou logicky řazeny, velmi pečlivě popsány a doplněny rozsáhlou obrazovou dokumentací a grafy; v tomto bodě je nutno konstatovat, že jednotlivé obrázky velmi přesně dokumentují dosažené výsledky a z hlediska grafického zpracování, jsou velmi pečlivě provedeny. Výsledky vychází z publikovaných prací autorky a není pochyb o tom, že se jedná o velmi kvalitní experimentální data, která významně přispívají k základnímu výzkumu časově závislých změn u neuronů a gliových buněk v průběhu Huntingtonovy choroby. Nicméně,

z klinického hlediska je přínosem této dizertační práce i pilotní studie týkající se aplikace erythropoetinu jako neuroprotektivní látky.

V diskusi (12 stran) autorka především rozebírá jednotlivé experimentální nálezy na pozadí dostupné světové literatury. Literární zdroje, celkem 337, jsou správně citovány a pokrývají jak starší práce, tak i novější poznatky z posledních let. Diskuze je opět velmi přehledná a dává dobrý obraz získaných výsledků a jejich možných aplikací. Závěrem autorka diskutuje i možné biomedicínské aplikace, týkající se ovlivnění progresu HD.

K předkládané dizertační práci nemám závažnější připomínky. Moje jediná připomínka, která nijak nesnižuje kvalitu předkládané dizertační práce, se týká výsledků, které popisují změny spotřeby kyslíku komplexem I u tg HD potkanů a jejich srovnání se stejně starými wt zvířaty. Graf 5. ukazuje, že klesající spotřeba kyslíku komplexem I u tgHD potkanů není signifikantní ve srovnání se stejně starými zvířaty. Proto na str. 95 (poslední věta) není vhodné, a z hlediska statistiky ani možné, používat termín „poměrně málo signifikantní“. Rozdíly mezi srovnávanými skupinami mohou být buď signifikantní a nebo z hlediska statistiky nevýznamné.

Dále mám jen drobné připomínky formálního charakteru (překlepy, zkratky):

-str. 9 chybí uvedení či definice zkratky HD, je uvedena až na str.11

-str.10 zkratka PD je již zavedena, ale nepoužívá se

-str. 13 překlep: zavezme? je do agregátů

-str. 23, 4.ř. překlep: promoteru

-str. 24, 11ř.zdola překlep: stadiích

-str. 30 v textu není definována zkratka WB, až na str.37

Zaujala mě celá řada výsledků a na jejich základě mám několik otázek.

- Autorka provedla Western blot analýzu, ale protože není prezentován žádný obrázek dokumentující rozdělení proteinů na SDS gelu, zajímalo by mě kolik isoform GFAP proteinu autorka detekovala, jejich molekulové hmotnosti a v neposlední řadě, jakou protilátku proti GFAP použila? Je známo, zda se exprese GFAP isoform mění u astrocytů s jejich aktivací jako je tomu u Alzheimerovy choroby?
- Jedna z isoform GFAP, GFAPdelta, je exprimována u reaktivních astrocytů, respektive u určité subpopulace reaktivních astrocytů. Je známo, zda se tato isoforma objevuje i u reaktivních astrocytů v progresi Huntingtonovy choroby (HD)?
- Na straně 23 autorka cituje práce týkající se knock-in (111 a 150 CAG repetací) myší, u kterých i přesto, že nedochází k úbytku neuronů byla popsána reaktivní glióza. Co aktivuje astrocyty u těchto modelů HD, jaká je reakce mikroglíí u těchto modelů HD ve srovnání s modely použitými autorkou?

- Mohla by autorka objasnit termín „pramenitá voda“, který byl použit v metodách, při přípravě 4% neutrálního formaldehydu?
- NG2 proteoglykan exprimující gliové buňky (NG2 glie) vykazují v CNS patologických stavech zvýšenou proliferaci i jejich následnou diferenciaci v reaktivní astrocyty. Funguje tento mechanismus gliogeneze také v průběhu Huntingtonovy choroby?
- Na str. 54 autorka zmiňuje GFAP⁺/S100β⁻astrocyty. S100β se používá jako marker astrocytů, který detekuje podstatně větší populaci astrocytů než GFAP. Mohla by autorka existenci GFAP⁺/S100β⁻astrocytů blíže objasnit?
- K úbytku neuronů u modelu neurotoxické léze dochází řízenou buněčnou smrtí (apoptózou), nebo se zde uplatňuje i autofagocytóza? Dochází v průběhu HD i k odumírání astrocytů, tak jak k tomu dochází v pozdějších stádiích např. ischemi/reperfúze?
- Je v současné literatuře popsáno použití i jiných neuroprotektivních či astrocytůzu potlačujících látek kromě erythropoetinu jako jsou např. endokanabinoidy nebo morfogeny a růstové faktory?

Dizertační práce Mgr. I. Gunčové je velmi aktuální a odpovídá současným směrům rozvoje oboru. Má vysokou odbornou i jazykovou úroveň a obsahuje mnoho zajímavých a v řadě případů i prioritních výsledků, které byly publikovány v časopisech s velmi dobrým impakt faktorem. Celá práce je velmi pečlivě napsaná, obsahuje řadu kvalitních histologických/imunohistochemických obrázků a přehledných grafů. V práci je pouze málo překlepů a jiných drobných chybností.

Mgr. I. Gunčová prokázala, že je připravena k samostatné vědecké práci a podložila tuto skutečnost velmi dobře vypracovanou dizertací, jejíž výsledky přinášejí další cenné poznatky o neurogenerativních onemocněních, jako je Huntingtonova choroba. Počet publikací v odborných časopisech překračuje počet k obhajobě požadovaný. **Doporučuji tedy tuto dizertační práci k obhajobě.**

V Praze, 29.8.2011

Ing. Miroslava Anděrová, CSc.
Ústav experimentální medicíny, AV ČR