

V Plzni 4.5.2019

MUDr. Karel Ježek, PhD.
Laboratoř experimentální neurofyzologie
Biomedicínské centrum
Lékařská Fakulta v Plzni
Univerzita Karlova
Alej Svobody 1655/76
32300 Plzeň

Oponentský posudek dizertační práce Mgr. Lenky Kletečkové „Význam NMDA antagonistů v animálních modelech ischemického poškození mozku a deprese“

Dizertace se věnuje mapování interakcí mezi několika zvolenými působky a NMDA receptorem v mozku laboratorních zvířat. Tematika je volena s jasnou perspektivou medicínské projekce do oblasti léčby onemocnění, v jejichž etiologii je zastoupena nadměrná stimulace neuronů glutamátergního typu, s přesahem mezi problematikou oborů neurologie a psychiatrie. Volba testovaných molekul vychází z aktuálních medicínských potřeb vyvinout látky s lepší specificitou vůči cílovému receptoru a s vhodnou charakteristikou působení ve smyslu poměru mezi terapeutickým účinkem a mírou vedlejších efektů na úrovních systému i celého organismu.

Dizertační práce má rozsah šedesáti devíti stran těla textu, doplněného o osobní poděkování, abstrakt, seznam zkratk, obsah, seznam referencí a přílohy reprintů klíčových prací, na nichž se autorka podílela. Vlastní text má klasickou formální strukturu, a čítá úvod do problematiky, vytyčení cílů a souvisejících hypotéz, popis zvolených metod a materiálu, výsledky a závěrečnou diskuzi se souhrnem.

Úvod práce se širokou literární rešerší je organizován fokusujícím způsobem od obecných zákonitostí glutamátové signalizace v mozku s popisem souvisejících typů receptorů, směrem k poznatkům týkajících se receptoru N-methyl-D-aspartátového typu. Autorka problematiku detailně popisuje jednak v rovině fyziologických procesů – zákonitosti přímého působení glutamátu včetně bohatých možností modulace funkce NMDA receptoru - a jednak v kontextu medicínském, kdy čtenáře seznamuje se známými patofyziologickými mechanizmy, jichž se NMDAR účastní, a dále i s jeho dosud jen hypotetickou,

spekulativní rolí v lidských neuropatologiích. Ve finální části úvodu pak detailně rozebírá působení neurosteroidů v centrálním nervovém systému.

Cíle práce jsou formulovány jasně. Dizertace se týká modulačního vlivu syntetických molekul na NMDA receptory. Jde o molekuly odvozené od neurosteroidu pregnanolonu, dále takrin, jeho 7-methoxyderivát a memantin, a finálně antagonistu NMDAR ketamin. Jejich společnou charakteristikou je inhibiční působení. U všech z nich je vysvětlen klinický kontext jejich eventuálního využití. Následují související přímočaré hypotézy ke každé dílčí studii.

V metodické sekci je adekvátně popsán výběr animálních modelů včetně operací čítající excitotoxické léze dorzálního hipokampu, fokální hippokampovou ischemii u mláďat a olfaktorickou bulbektomii. Důvody provedení těchto zákroků jsou dostatečně zdůvodněny na experimentální i etické úrovni. Behaviorální metody byly zastoupeny testováním kognitivních schopností klasickou procedurou ve vodním bludišti. Z krevních vzorků byla analyzována úroveň fosforylace signální dráhy mTOR. Histologické zpracování vzorků bylo provedeno detekcí poškozených buněk ve sledovaných oblastech mozku barvením Fluoro Jade B.

Výsledky:

V první studii se autoři zabývali neuroprotekcí $3\alpha5\beta$ -pregnanolon-glutamátu při fokálním ischemickém stavu, kdy dochází k masivnímu vylití glutamátu způsobujícího excitotoxické léze zasažených oblastí. Tlumivý vliv neurosteroidu na NMDAR tak může toto poškození omezit. Nejprve byl úspěšně vyloučen event. neurotoxický efekt pregnanolonu na nedospělou nervovou tkáň. V hlavním experimentu poté histologickou analýzou rozsahu organického poškození zvolených oblastí autoři prokázali dávkově vázaný neuroprotektivní vliv pregnanolonu, jež ve vyšší ze zvolených dávek toxický vliv infuze endothelinu-1 téměř eliminoval.

Součástí další studie byl experiment s cílem prokázat protektivní efekt dalšího derivátu pregnanolonu – pregnanolon hemipimelátu, funkčním testováním hippokampového systému v testu prostorového učení ve vodním bludišti. Pět minut po indukci NMDA léze dorzálního hipokampu byl systémově podán PG hemipimelát a o týden později byl efekt testován behaviorálně. Efekt dosáhl dílčí statistické významnosti pouze během jednoho dne experimentu. Ale z výsledků je patrné, že toto bylo způsobeno spíše faktickou nemožností efekt prokázat vzhledem k absenci výraznějšího rozdílu mezi postiženou kontrolní skupinou a hlavní kontrolou bez hippokampové léze.

Třetí studie srovnává neuroprotektivní efekt molekul takrinu, 7-derivátu takrinu a memantinu u hippokampového excitotoxického poškození většího rozsahu. Prezentovaný experiment navazuje na výsledky spolupracujícího týmu, charakterizující mechanismy jejich modulačního působení na NMDAR. Metodou hodnocení účinku bylo opět histologické stanovení míry poškození po infúzi NMDA a NMDA v kombinaci se studovanými látkami. Výsledky ukázaly na absenci efektu aplikace takrinu a klinicky

používaného memantinu, zatímco 7-derivát takrinu vykazoval protektivní efekt ve všech hodnocených částech dorzálního hipokampu.

Poslední práce je vystavěna na bulbektomickém modelu deprese a cílem bylo prokázat mechanismus antidepressivního působení ketaminu. Prezentovaná alikvotní část článku spočívá v hodnocení míry aktivace mTOR signální dráhy ELISA metodou. Autoři našli dle očekávání zvýšenou aktivaci mTOR po podání ketaminu, naopak, nepředpokládaně blokátor mTOR podaný před aplikací ketaminu její aktivaci nepotlačil. V diskuzi nastiňují možnost interakce podávaného ketaminu a mTOR blokátoru se stresem.

Následná diskuze výsledky sumarizuje a vkládá je do širšího oborového kontextu včetně výčtu perspektiv, jež dosažené výstupy experimentů nabízejí.

Mgr. Kletečková předloženými pracemi stvrdila schopnost zkoncipovat, metodicky naplánovat a prakticky provést vědecký experiment včetně statistického zpracování dat a následné interpretace výsledků. Během svého postgraduálního studia zvládla široké spektrum technik, od laboratorních analýz, přes techniky kvantitativní histologie, mozkové operace, až po behaviorální testování laboratorních zvířat.

Dle mého soudu je předložená práce zcela v souladu s nároky na udělení titulu PhD., a souhlasím s jejím postoupením k formální obhajobě. Po adekvátní reakci na připomínky a dotazy doporučuji udělení titulu PhD.

Připomínky:

Vzhledem k tematickému vymezení práce na NMDA receptor a jeho relevancí v procesech učení a paměti, bych v úvodu uvítal jeho začlenění v kontextu historického formování moderních představ o buněčných mechanismech paměti, které nyní představují konceptuální základ našich znalostí. Mám na mysli teoretické úvahy D. Hebba, které s mnohaletým předstihem předpověděly mechanismus vzniku paměťových stop (hebbovská plasticita), v nichž NMDA receptor, vzhledem ke své charakteristice detektoru koincidence vstupních informací, hraje centrální roli.

Dotazy:

1. V práci studující protektivní efekt pregnanolon hemipimelátu je funkční dopad v kontrolní skupině s NMDA lézemi překvapivě malý. Zvířata vykazují hendikep pouze ve druhém ze čtyř testovacích dnů, zatímco ve zbylých dvou dosahují statisticky velmi srovnatelná skóre. To implikuje, že proceduru, která vyžaduje víceméně intaktní hipokampus, si jsou schopna plně osvojit. U subjektů se silným excitotoxickým poškozením dorzálního hipokampu je očekávána naopak neschopnost cíl ve vodním bludišti během takto

krátké procedury lokalizovat. Je možno doložit rozsah lézí? V publikovaném článku ani v dizertační práci toto není diskutováno

Prosím vysvětlete tento rozpor.

2. Přirozené hladiny steroidních hormonů se kategoricky liší u obou pohlaví. Předložené experimenty byly kromě mláďat prováděné pouze na dospělých samcích laboratorních potkanů. Lze očekávat, že samice budou vůči některým ze studovaných látek zcela jinak responzivní, patrně i v závislosti na momentální fázi estru.

Máte představu, jak aplikované molekuly interagují se samičím organizmem – třeba na základě pilotních dat? Nejsou-li k dispozici, prosím poreferujte o souvisejících datech z dostupných studií.

Děkuji za příležitost se s pracemi Mgr. L. Kletečkové seznámit, a za důvěru v oponentské roli.

S pozdravem,



Karel Ježek