

Oponentský posudek doktorské práce

název: Neuroprotektivní účinky nových anorektických analogů peptidu uvolňujícího prolaktin (PrRP) v modelech neurodegenerace *in vitro* a *in vivo*

autorka: Ing. Anna Mengr (roz. Zmeškalová)

Disertační práce se zabývala velmi aktuálním tématem propojujícím změny metabolického stavu organismu s neuronálními a zánětlivými procesy v mozku, které mají souvislost s rozvojem tak závažného onemocnění, jakým je Alzheimerova choroba. Výsledky práce byly publikovány v 4 článcích v mezinárodních časopisech s IF a prošly tak recenzním řízením. Jedná se o 2 práce *in extenso* (na obou pracích je studentka první autorkou) a 2 přehledové články.

Práce se skládá ze 3 samostatných částí, kdy první dvě se zabývají sledováním účinků a mechanismu působení neuropeptidu PrRp31 v jeho nativní formě a jeho lipidovaného analogu palm₁₁-PrRP31, a třetí část se zabývá vlivem inzulínové rezistence indukované vysokotukovou dietou na ukazatele patologie se vztahem k Alzheimerově chorobě u myšího modelu této choroby.

Autorka prokázala, že v *in vitro* podmínkách neuropeptid i jeho lipidovaná forma významně aktivovaly signální dráhy typické pro insulin podporující přežití a růst buněk a potlačily apoptózu v buňkách SH-SY5Y stresovaných methyglyoxalem. V *in vivo* podmínkách dlouhodobá subkutánní aplikace palm₁₁-PrRP31 myšímu modelu Alzheimerovy choroby (APP/PS1) signifikantně snížila množství A β plaků a mikrogliózu v hipokampu, kortexu a mozečku, zvýšila synaptogenezi a zmírnila centrální zánět a apoptózu v hipokampu. V poslední části vedlo krmení těchto myší vysokotukovou dietou k periferní a centrální inzulínové rezistenci, vyvolalo neurozánět, a zhoršilo A β patologii v hipokampech. Korelace všech těchto získaných výsledků podporuje možnou příčinnou souvislost mezi zánětem souvisejícím s obezitou a prediabetem na rozvoj patologie v mozku typické u Alzheimerovy choroby.

I přesto, že některé výsledky jsou potvrzením dřívějších zjištění, studie přinesla také naprosto unikátní a důležité poznatky, jako je především důkaz možnosti ovlivnění patologického stavu myšího modelu této choroby po periferním podání peptidu díky úpravě jeho struktury potřebné pro přestup přes hematoencefalickou bariéru. Studie má tak přesah do translačního výzkumu, který může potenciálně přispět k léčbě závažného onemocnění.

Formální stránka

Práce je psána anglicky, celá se skládá ze 149 stran, kde 26 stran je věnováno Úvodu, 13 stran Metodám, 43 stran Výsledkům, 15 stran Diskuzi, 26 stran Citacím, a po jedné straně je věnováno Abstraktu, Cílům, Souhrnu, Závěru a Seznamu publikací autorky. Práce obsahuje též pečlivě vypracovaný seznam zkratk. K textu jsou přiloženy též kopie všech 4 publikovaných prací.

Po formální stránce je práce mimořádně kvalitní, psaná velmi čtivě, edukativní a srozumitelnou formou. Velmi oceňuji relevantní obrazovou dokumentaci pro snadnou orientaci v tématu. Autorka zvládla postihnout obsahově úvod tak, aby shrnula všechny informace potřebné pro pochopení jejího experimentálního záměru. Výsledky jsou též obsáhle diskutovány s ohledem na dříve publikované práce. Text obsahuje jen velmi malé množství překlepů.

Pro formální správnost měl být uveden u seznamu publikací autorky též její konkrétní podíl na jejich vzniku, i přesto že při prvoautorství není o zásadním významu jejího podílu na obou publikacích žádných pochyb.

Obsahová stránka

K práci mám následující připomínky či poznámky:

- V seznamu odkazů na literaturu je stránka 145-146 zdvojnásobena
- Z textu na str. 57 a legendy k Fig. 11 a 12 na str. 58 není u vyznačených signifikancí zřejmé, které skupiny jsou v rámci post hoc testu vzájemně porovnávány.
- Na str. 59 a dále i v Diskuzi na str. 103 je uvedeno, že SB216736 je selektivním inhibítorem GSK3 β . Specifický inhibítor pro β formu však neexistuje. Použitý inhibítor má stejnou afinitu i ke GSK3 α (IC₅₀=34.3 nM pro obě formy). Správněji by tedy bylo hovořit pouze o mechanismu souvisejícím obecně s GSK3.
- V kapitole Statistické analýzy chybí popis, jak byly vyhodnocovány výsledky zobrazené ve Fig. 15-18, kde je v legendě k těmto obrázkům uveden „Student t-test“. Z povahy výsledků by i tato data měla být posouzena pomocí one-way ANOVA (stejně jako např. u Fig. 14).
- V Autoreferátu jsou ve Fig. 4 špatně označeny panely s obrázky pro jednotlivé experimentální skupiny! V odpovídajícím Fig. 19 v plné verzi je toto označení v pořádku.
- Fig. 26 – kvantitativní vyhodnocení IHC je vždy trochu výzva, zde byla použita metoda měření „% of stained area“ která v podstatě vypovídá o počtu pozitivních buněk spíše než změně intenzity barvení na buněčné úrovni a je závislá na srovnatelné kompaktnosti tkáně u srovnávaných skupin. Byly použity i jiné metody vyhodnocení? Případně by bylo vhodnější provést funkční test propustnosti bariéry.
- Jak lze vysvětlit, že glukózová homeostáza (Fig. 29) byla vysokotukovou dietou ovlivněna pouze u 6-mesíčních a nikoliv u starších WT a APP/PS1 myši (10 měsíců)?
- Existují studie, které dokládají, že insulin je tvořen také přímo v mozku. Jak je jeho tvorba řízena a ví se něco o jeho případném podílu na rozvoji Alzheimerovy choroby?

Obecný komentář

Vzhledem k tématu disertační práce čtenář logicky očekává, že v závěrečné studii bude testován vliv palm11-PrRP31 na dopad vysokotukové diety u myšičího modelu Alzheimerovy choroby. Pokud toto testování nebylo v rámci disertační práce záměrem, dovoluji si jen zcela nevýznamnou osobní poznámku, že by bylo možná logičtější uvést poslední část práce o vlivu vysokotukové diety jako první, následovanou oběma studiemi o vlivu zkoumaného neuropeptidu.

Závěr

Závěrem bych ráda shrnula, že předkládaná disertační práce je velmi kvalitní a přináší originální a významné výsledky. Autorka jednoznačně prokázala, že je schopna nejen provádět náročné experimenty, ale také pracovat s literaturou a výsledky přehledně a poutavou formou prezentovat. Předkládaná disertační práce splňuje všechna požadovaná kritéria. Doporučuji proto, aby byl autorce po jejím obhájení udělen titul Ph.D.

V Praze 21. září 2022

Prof. PharmDr. Alena Sumová, CSc., DSc.