



2. LÉKAŘSKÁ FAKULTA UNIVERZITA KARLOVA

Ústav fyziologie 2. lékařské fakulty Univerzity Karlovy
Přednosta: prof. MUDr. Přemysl Jiruška, Ph.D.

OPONENTSKÝ POSUDEK DIZERTAČNÍ PRÁCE DOKTORSKÉHO STUDIJNÍHO PROGRAMU NEUROVĚDY

Autor: Mgr. Tereza Filipi

Název práce: Glial Cells in Progression of Amyotrophic Lateral Sclerosis (Gliové buňky v progresi amyotrofické laterální sklerózy)

Oponent: MUDr. Helena Pivoňková, Ph.D.

Souhrn práce:

Předložená dizertační práce Mgr. Terezy Filipi má standardní členění zahrnující úvod, cíle práce, metodiku, popis výsledků, diskuzi, závěr a souhrn práce, a seznam literatury. Rozsahem se jedná o 80 stran (počínaje Úvodem, bez referencí, počet referencí je 264). K práci jsou jako appendix připojeny 4 impaktované publikace v přímém vztahu k dizertační práci. Tři publikace obsahují původní experimentální data a Mgr. Filipi je první autorkou na dvou z nich, čtvrtá práce je přehledný článek, na kterém je Mgr. Filipi spoluautorkou.

Dizertační práce „Gliové buňky v progresi amyotrofické laterální sklerózy (ALS)“ od Mgr. Terezy Filipi se zabývá potenciálně klíčovou, ale dosud nedostatečně prozkoumanou rolí gliových buněk v patogenezi ALS. ALS je fatální neurodegenerativní onemocnění charakterizované progresivní ztrátou motorických neuronů. Studie se zaměřuje na astrocyty, mikroglie a oligodendrocyty, přičemž zdůrazňuje jejich dvojí úlohu – podpůrnou i potenciálně škodlivou – během progresu onemocnění. Navíc se studie soustředí na změny v motorickém a somatosenzorickém kortexu, které jsou méně prozkoumané ve srovnání se změnami, ke kterým dochází v míše během rozvoje onemocnění ALS. Poslední část práce se zaměřuje na dysfunkci gliových buněk v Alzheimerově chorobě (Alzheimer disease, AD).

V Úvodu jsou popsány gliové buňky a jejich základní fyziologické funkce, na které navazuje kapitola o funkcích gliových buněk v patologii. Dále je zde kapitola o ALS a o myších modelech ALS, a kapitola o AD.

Použité metodiky zahrnují některé inovativní a pokročilé přístupy včetně selektivního sortování gliových buněk a sekvenování na úrovni jedné buňky. Tyto metody jsou pak doplněny a jejich výsledky srovnávány s výsledky experimentů zahozených na více tradičních přístupech (např. imunohistochemie), a na specifických funkčních přístupech (3D-morfometrie, iontoforetické metody). Funkční analýzy, jako jsou iontoforetická metoda v reálném čase a 3D-morfometrie, byly použity pro vyhodnocení schopnosti astrocytů udržovat iontovou homeostázu a objem, zejména homeostázu draselných iontů. Dále jsou v práci použity behaviorální metody pro stanovení funkčního deficitu u myších modelů onemocnění.

Práce si klade za cíl přispět k lepšímu pochopení role gliových buněk v neurodegenerativních procesech a identifikovat nové terapeutické cíle pro léčbu ALS a AD. Cíle této disertační práce jsou rozděleny do tří

hlavních částí, které se zaměřují na různé aspekty výzkumu role gliových buněk v progresi ALS a AD, a které odpovídají tématům jednotlivých původních impaktovaných publikací. Tyto cíle jsou následující:

1. *Vyhodnocení vlivu ALS na gliové buňky v mozkové kůře myšího modelu SOD1(G93A).* Tato část vychází z hypotézy, že gliové buňky v mozkové kůře jsou ovlivněny patologickými změnami spojenými s ALS. Pomocí pokročilých metod, jako je sekvenování na úrovni jedné buňky, bylo cílem odhalit jemné změny v kortikálních gliích a zhodnotit tak rozsah vlivu ALS na gliové buňky v mozkové kůře v myším modelu ALS.
2. *Zkoumání schopnosti astrocytů regulovat iontovou homeostázu v ALS.* Zde autorka vychází z hypotézy, že patologické procesy spojené s ALS mohou ovlivnit schopnost astrocytů udržovat iontovou homeostázu, což může mít vliv na mikroprostředí CNS a progresi nemoci. Cílem tedy bylo odhalit schopnost astrocytů regulovat iontovou homeostázu v mozkové kůře a v míše u myšího modelu ALS.
3. *Charakterizace schopnosti astrocytů udržovat iontovou rovnováhu v modelu AD.* V patologických stavech, jako je AD, může stárnutí a progresse onemocnění ovlivnit schopnost astrocytů regulovat iontovou homeostázu a objem. Cílem práce bylo charakterizovat schopnost astrocytů regulovat vychytávání iontů a objem během progresse onemocnění, a zároveň analyzovat difuzní vlastnosti extracelulárního prostoru v myším modelu AD.

Výsledky práce odhalily pouze mírné změny na úrovni transkriptomu u kortikálních gliových buněk, především u mikroglíí a u oligodendrocytů. Nejzajímavější se v tomto případě jevil SOD1-specifický klastř pravděpodobně poškozených oligodendrocytů, jehož přítomnost ale nebyla potvrzena jinými metodami. Zároveň kortikální astrocyty nevykazovaly významné funkční změny v udržování iontové homeostázy, nicméně v tomto směru byly nalezeny funkční změny u astrocytů v míše. Výsledky tak odhalily významné rozdíly v objemových změnách pravděpodobně svědčící o dysfunkci míšních astrocytů, včetně sníženého vychytávání draselných iontů a snížené exprese Kir4.1 kanálů, které tak mohou přispívat k progresi ALS. Zajímavým výsledkem je analýza koncentrace jednotlivých iontů v mozkomíšním moku u myší s rozvinutými příznaky ALS. V modelu AD byly odhaleny specifické změny v udržování iontové homeostázy a objemu u astrocytů především v hyperkalemickém prostředí, a zároveň změny v difuzních parametrech extracelulárního prostředí. Jak autorka uvádí, popsané změny mohou naznačovat, že z pohledu objemové regulace astrocytů lze tyto změny vnímat jako zrychlenou formu fyziologického stárnutí.

V diskuzi se autorka věnuje například omezením současných myších modelů ALS, kdy byly ve srovnání s daty získaných od pacientů v pozdních fázích nemoci zaznamenány jen minimální změny kortikálních glií, a zdůrazňuje tak potřebu spolehlivých zvířecích modelů. Autorka také diskutuje rozdíly ve výsledcích experimentů způsobené odlišným genetickým pozadím různých myších kmenů. Srovnání s chováním astrocytů v modelu AD poskytlo další poznatky o chování astrocytů napříč různými neurodegenerativními onemocněními.

Hodnocení práce:

Dizertační práce Mgr. Terezy Filipi se věnuje aktuálnímu tématu, kam v současnosti nevyčlelitelná neurodegenerativní onemocnění bezesporu patří. Na toto téma autorka nahlíží z méně tradiční perspektivy homeostázy a funkce gliových buněk. Po formální stránce úprava práce plně vyhovuje formálním požadavkům na doktorskou práci. Úroveň angličtiny je velmi dobrá. Práce ale obsahuje některé drobné nedostatky ve formátování nebo v používání zkratk a podobně, viz níže. Z práce bohužel nelze vyrozumět, které experimenty dělala sama autorka a které metodiky si tedy nejlépe během svého postgraduálního studia osvojila.

Úvod je napsaný přehledně a srozumitelně, nicméně vzhledem k rozsahu daných témat (více typů gliových buněk, více patologií) nedovoluje zajít do větší hloubky současného stavu poznání. Na rozdíl od ALS zde chybí kapitola o myších modelech AD.

V první části práce autorka používá pokročilé metody sekvenování na úrovni jednotlivých buněk k vyhodnocení stavu gliových buněk v mozkové kůře v myším modelu ALS. Chybí zde ovšem zhodnocení neuronální patologie v kortexu. Patologický fenotyp u myši může vycházet z odumírání motoneuronů v míše a kortikální změny u neuronů mohou být minimální, stejně jako jsou minimální nalezené změny u kortikálních gliových buněk. Přes použití inovativních přístupů tedy zůstává otázkou, jestli jsou tyto přístupy dostatečně senzitivní pro detekci jemných patologických změn, nebo jestli se kortikální změny vyvíjí ještě v pozdějších stádiích onemocnění.

Ve druhé části své práce se autorka zaměřila na funkční zhodnocení gliových buněk, konkrétně astrocytů, a na jejich schopnost objemové regulace. Tento postup je pochopitelný, protože dysfunkce homeostatických procesů u astrocytů by mohla vést k dysfunkci neuronů. Opět ale chybí srovnání se stavem neuronů v kůře. Protože experimenty v kůře nepřinesly signifikantní výsledky, autoři dále zkoumali homeostatické funkce astrocytů v míše. Zde se již patologie projevila a je škoda, že zde nebyla, podobně jako u gliových buněk v mozkové kůře, provedena analýza pomocí single-cell sekvenování. Z definovaných cílů práce vyplývá, že se autorka specificky chtěla zaměřit na změny u gliových buněk, které jsou vyvolané patologickým procesem. Zde by ovšem bylo zajímavé se podívat i na to, jestli funkční změny u astrocytů předcházejí patologickým projevům onemocnění a tedy jestli k rozvoji onemocnění přispívají.

Ve třetí části práce byl použit podobný postup zkoumání homeostatických procesů u astrocytů, tedy pomocí metody fluorescenční 3D-morfometrie, tentokrát v myším modelu AD. Výsledky byly srovnávány s výsledky difuzních parametrů tkáně získaných pomocí iontoforetických metod. Zde lze pozitivně hodnotit především snahu o použití různých komplementárních metod a snahu o popis dysfunkce gliových buněk v průběhu rozvoje onemocnění.

V diskuzi by se autorka mohla více věnovat translačnímu potenciálu svého výzkumu a lépe zhodnotit propojení výsledků z myších modelů vůči nálezům u pacientů s ALS a AD, případně srovnání s dalšími neurodegenerativními stavy.

Celkově lze zhodnotit, že práce Mgr. Filipi přinesla nové důležité poznatky o funkci gliových buněk, především astrocytů, v neurodegenerativních onemocněních mozku a míchy.

Menší formální nedostatky:

Některé zkratky nejsou v textu při prvním použití vysvětlené (např. DEA).

V seznamu literatury se dnes již běžně uvádí Digital Object Identifier (DOI), což zde úplně chybí.

Formátování - Figure 17 – popis se slil s ostatním textem.

Figure 19 je doprovázen zavádějícím popisem, kde se pravděpodobně nejedná o GFAP barvení.

Tabulka 3 – výraz mM/l není správný, buď se používá mM (milimolární roztok) nebo mmol/l (koncentrace x milimolů na litr). Dále je potřeba uvádět, zda se jedná o ionty, tedy Ca²⁺, K⁺, atd., podobná chyba se objevuje ve Figure 24.

V textu je někdy odkaz na obrázky ve formě „Fig.“ a někdy ve formě „Figure“.

Reference č. 114, 190 – chyby ve formátu reference.

Otázky oponenta:

1. Protože v práci chybí validace myšího modelu ALS co se týká poškození neuronů v mozkové kůře, mohla by autorka dovysvětlit, jestli tato validace byla provedena již dříve v tomto modelu ALS, a zároveň jaké neuronální a gliální poškození se objevuje u lidí s ALS v mozkové kůře? Mohou tyto změny v mozkové kůře předcházet projevům onemocnění a přispívat k nim, nebo jsou spíše sekundárního charakteru?
2. Mezi první a druhou prací jsou určité diskrepance ve výsledcích. V první práci nejsou žádné rozdíly v GFAP barvení v mozkové kůře a tedy nebyla prokázána astroglióza, ale ve druhé práci autorka ukazuje zvýšené barvení, tedy přítomnou reaktivní astrogliózu v mozkové kůře. Autorka zmiňuje jiné genetické pozadí myší. Má pro toto vysvětlení nějaké další důkazy, například z literatury? V textu k Fig. 19 je sice zmíněné GFAP barvení, ale na obrázku to vypadá spíše jako eGFP-pozitivní buňky v myších zkřížených (SOD1/GFAP/EGFP myši). Mohla by autorka vysvětlit tuto diskrepanci? Bylo v těchto křížencích použito GFAP barvení nebo byla astroglióza kvantifikovaná na základě eGFP intenzity (jak je zmíněno v prvním odstavci příslušné kapitoly)?
3. Funkční analýza se zaměřuje na roli astrocytů v homeostáze draselných iontů. Jaké jiné metody by se daly použít pro zkoumání míry astrocytů pufrovat extracelulární K^+ ? Proč zde nebyly použity? Které z těchto metod jsou přesnější, respektive mohou odhalit jemnější změny?
4. U obou patologií se u astrocytů objevuje snížený swelling a zároveň nižší změny extracelulárního objemu v odpovědi na hyperkalémii. Jakým způsobem k tomuto jevu může docházet? Mohla by autorka vysvětlit mechanismus? Mohl by mít spíše poškozující nebo protektivní vliv na rozvoj onemocnění?
5. Lze na základě získaných dat navrhnout experimentální postup nebo postupy, kterými by bylo možné upravit homeostatické funkce astrocytů a tedy teoreticky zastavit progresi onemocnění? Byly takto cílené terapeutické postupy v minulosti použity? Bylo by teoreticky možné je použít i u pacientů s ALS, případně AD? Jsou nějaké terapeutické postupy, například ve fázi klinických studií, cílené na gliové buňky?

Závěr

Předložená disertační práce Mgr. Terezy Filipi splňuje navzdory zmiňovaným drobným nedostatkům formální i obsahové předpoklady k získání titulu Ph.D. v doktorském studijním programu Neurovědy na 2. lékařské fakultě Univerzity Karlovy v Praze. Dizertační práce prokazuje předpoklady autorky k samostatné vědecké práci. Velice kladně lze hodnotit to, že autorka během svého Ph.D. studia publikovala 2 původní práce jako první autorka. Dizertační práci proto doporučuji k obhajobě podle § 47 Zákona o vysokých školách 111/98 Sb.

V Praze dne 2.12.2024

MUDr. Helena Pivoňková, Ph.D.