

## **Oponentský posudek**

Dizertační práce Mgr. Magdaleny Kulijewicz-Nawrot

„Astrocytic changes in a mouse model of Alzheimers disease“

(Praha 2014)

### **1. Úvod**

Předložená dizertační práce má formu díla vytištěného na kvalitním křídovém papíru, svázaného v pevných deskách. Dizertace sestává ze dvou částí: první část tvoří 136 stran vlastního textu, druhou pak kopie tří prací, týkajících se hlavních témat studie, publikovaných v odborných časopisech s IF.

#### ***Struktura první části dizertace:***

a) za titulní stranou následují *Prohlášení, Acknowledgements a Table of Contents*;  
b) vlastní dizertace se skládá z deseti kapitol: 1. *Introduction* (60 stran), 2. *Aims and hypothesis* (1 strana), 3. *Materials and methods* (10 stran), 4. *Results* (28 stran), 5. *Discussion* (12 stran), 6. *Conclusions* (1 strana), 7. *Summary* (2 strany), 8. *Souhrn* (2 strany), 9. *References* (20 stran) a 10. *Publications* (1 strana) – na seznamu jsou uvedeny tři práce, v nichž dizertantka je dvakrát první autorkou (2xIF) a jednou spoluautorkou (1xIF). Text je doplněn 33 obrázky/tabulkami v dokonalém černobílém nebo barevném provedení.

#### ***Obsah druhé části dizertace:***

Součástí druhé části dizertace jsou kopie tří originálních prací:

1. Kulijewicz-Nawrot M, Syková E, Chvátal A, Verkhatsky A, Rodríguez JJ. Astrocytes and glutamate homeostasis in Alzheimer's disease: a decrease in glutamine synthetase, but not in glutamate transporter-1, in the prefrontal cortex. *ASN Neuro*. 2013 Oct 7;5(4):273-82. doi: 10.1042/AN20130017. IF: 2.357

2. Kulijewicz-Nawrot M, Verkhratsky A, Chvátal A, Syková E, Rodríguez JJ. Astrocytic cytoskeletal atrophy in the medial prefrontal cortex of a triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Anat.* 2012 Sep;221(3):252-62. doi: 10.1111/j.1469-7580.2012.01536.x. IF: 3.638

3. Rodríguez JJ, Yeh CY, Terzieva S, Olabarria M, Kulijewicz-Nawrot M, Verkhratsky A. Complex and region-specific changes in astroglial markers in the aging brain. *Neurobiol Aging.* 2014 Jan;35(1):15-23. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2013.07.002. IF: 6.166

## **2. Posudek dizertace**

Dizertace je napsána velice kvalitní angličtinou i přesto že některé pasáže obsahují data nebo technické termíny. Formální členění textu i dokumentace jsou přehledné a zajišťují dobrou orientaci v celé práci. V textu jsem nenalezl žádné překlepy.

### **1. Volba tématu**

Zvolené téma dizertační práce považuji za velmi vhodné, neboť se jedná o aktuální a klinicky závažnou problematiku s řadou doposud neobjasněných aspektů, k jejichž řešení lze dospět i morfologickými a experimentálními přístupy.

### **2. Cíl práce**

Jako cíl své práce si autorka zvolila studium funkčních a morfologických změn v astroglii v pokusu na zvířeti za pomoci experimentálního modelu Alzheimerovy nemoci (3xTg-AD myš). K dosažení tohoto cíle se zaměřila na a) charakteristiku změn astroglie v mPFC, b) vztah mezi beta-amyloidem a GFAP pozitivními astrocyty v mPFC, c) funkční změny v metabolismu glutamátu v astroglii (glutamin syntetáza a GLT-1), studium vztahů ve strukturách majících vazbu na změny astroglie u AD (hipokampus, entorhinální kůra, mediální prefrontální kůra) a expresi specifických markerů astroglie (GFAP, S100beta a GS) během stárnutí v hipokampu a entorhinální kůře.

### **3. Metodiky**

Imunohistochemická analýza – detekce peroxidázovou reakcí a následná DAB metodika.

Fluorescence – stanovení GFAP pozitivních astrocytů (a vztah k A $\beta$ ), GFAP-GS kolokalizace, single a double direct imunofluorescence.

Stereologie, volumetrie – software Cell Analyst (rekonstrukce 3D obrazu renderováním povrchu buňky a 2D rekonstrukce objemovým renderováním, měření povrchu těl buněk pomocí stereologického programu ImageJ, kolokalizace GS-IR a GFAP-IR astrocytů v mPFC za pomoci konfokálního mikroskopu

Western blot – SDS (PAGE) elektroforéza a detekce proteinů GS a GLT-1

Statistická analýza – GraphPad Prism program, jednocestná ANOVA a lineární regrese

#### **4. Výsledky**

Jsou rozděleny v souladu s třemi publikacemi s IF uvedenými v druhé části dizertace. Dělí se na výsledky a) změn tvaru a povrchu astrocytů v 1-5 vrstvě mPFC u kontrol a 3xTg-AD transgenních myší + stanovení intracelulární akumulace A $\beta$  a vazbě na GFAP, b) stanovení exprese glutamin syntetasy (GS) a glutamátového transportéru (GLT-1) u astrocytů v mPFC u časných a pozdních změn při progresi AD a c) stanovení profilu astroglie v oblastech entorhinální kůry, gyrus dentatus a CA1 imunohistochemicky pomocí GFAP, GS a barvení S100 $\beta$  v různých časových obdobích vývoje (3, 9, 18 a 24 měsíců).

#### **5. Závěr**

-cíl dizertační práce byl stanoven přiměřeně současnému stavu poznání o neuroglii a Alzheimerově nemoci a přiměřeně možnostem a zkušenostem dizertantky;

-použité metodiky, opírající se o dosavadní zkušenosti mateřských i světových pracovišť, byly adekvátní požadavkům řešení a současně i mimořádně náročné pro svoji složitost a množství paralelně sledovaných parametrů;

- dosažené výsledky jednoznačným způsobem rozšiřují a obohacují dosavadní znalosti morfologie, cytoarchitektoniky a imunohistochemie a fyziologie astroglie ve vztahu k Alzheimerově nemoci v experimentu na zvířeti, závěrečná kapitola navíc poskytuje dobré východisko pro pokračování studie směrem k objasnění odlišných metabolických dějů astroglie v oblasti entorhinální kůry v porovnání s gyrus dentatus a CA1 a tím k přispění k odhalení samotného mechanismu stárnutí mozku;

- stanovený cíl práce byl tedy splněn, zvolené téma je nosné, má dobrou šanci na své pokračování a tím na dořešení velké části dosud neúplně známé role astroglie v patogeneze Alzheimerovy nemoci.

### 3. Připomínky a otázky

K posuzované dizertační práci nemám připomínky

Na závěr svého hodnocení si dovoluji dizertantce předložit následující otázky:

Otázka č.1: Jak vyplývá z grafu na str. 77, obrázek C, u tříměsíčních myší byl povrch pozitivní pro GFAP větší u 3xTG-AD skupiny než u kontrol ve čtvrté vrstvě mPFC. Dále pak na obrázku H objem rovněž čtvrté vrstvy mPFC byl v případě 3 měsíců snížen mnohem méně u 3xTG-AD než u jiných vrstev. Jaké by bylo možné vysvětlení?

Otázka č.2: z grafu na str. 92 vyplývá, že entorhinální kůra v kontrastu s gyrus dentatus a CA1 vykazuje opačný trend z hlediska povrchu, celkového a tělového objemu buněk z hlediska GFAP positivity, což je anatomicky dobře vidět i na obr. 28. Jak by se to dalo vysvětlit v souvislosti s počátkem změn na neuronech u AD za které je právě považována entorhinální kůra? Bylo by možné, že právě absence změn v GS profilech v astroglii entorhinální kůry u starých jedinců by měla za následek zhoršení metabolismu neuronů (díky jakési ztrátě plasticity funkce astroglie)?

### 4. Závěr

Zcela na závěr je možno uvést, že jsem na základě pečlivého prostudování dizertační práce došel k názoru, že dizertantka svými výsledky jednoznačně prokázala schopnost tvořivé vědecké práce, a to jak samostatně, tak i v kolektivu, skládajícím se z pracovníků zejména experimentálních oborů. Velice pozitivně rovněž hodnotím skutečnost, že kolegyně mgr. Kulijewicz-Nawrot umí ve vědecké práci skloubit metody morfologické, imunohistochemické, stereologické i biochemické a to na současné špičkové úrovni. Jsem proto přesvědčen, že kolegyně mgr. Kulijewicz-Nawrot velmi dobře naplnila všechna kritéria, požadovaná pro završení postgraduálního studia ve svém oboru. Doporučuji proto, aby na základě předložených výsledků a jejich úspěšné obhajoby byl mgr. Kulijewicz-Nawrot udělen, v souladu se zákonnými předpisy, vědecký titul

PhD.

v oboru neurověd.

Praha, 14.2.2014

Doc.MUDr.Petr Zach, CSc.

Ústav anatomie 3. LF UK v Praze