

Posudek disertační práce

## **Neuroinflammation and mechanisms of neuropathic pain development**

Mgr. Nataliia Kalynovska

Disertační práci Mgr. Nataliia Kalynovská vypracovala v rámci doktorského studia na Přírodovědecké fakultě Univerzity Karlovy ve Fyziologickém ústavu Akademie věd ČR na oddělení Funkční morfologie. Vedoucím práce byl MUDr. Jiří Paleček, CSc. Tématem disertační práce bylo studovat účast aktivace imunitního systému při vzniku neuropatické bolesti. Autorka se zaměřila na protizánětlivé působení blokátoru angiotenzinových receptorů typu 1 (AT1R) – losartanu ve dvou modelech periferní neuropatie a to jak v modelu poškození periferního nervu (podvázání míšního nervu), tak neuropatie navozené podáváním chemoterapeutika paclitaxelu. V další části práce se autorka věnovala zapojení vaniloidních receptorů typu 1 (TRPV1) do procesů vzniku neuropatické bolesti vlivem paclitaxelu nebo chemokinu CCL2 na míšní úrovni.

Disertační práce je logicky členěná a obsahuje všechny požadované součásti. Literární přehled poskytuje v úvodu ucelený popis anatomie a funkce systému vedení bolestivých podnětů. Následuje podrobný rozbor dosud známých poznatků o vlivu aktivace součástí imunitního systému zejména makrofágů a glií na neuropatickou bolest. Metodická část je bohatá. Autorka ke splnění cílů využila široké spektrum metod od práce se zvířaty (behaviorální pokusy, operační procedury) přes *in vitro* pokusy (akutní míšní řezy) až po biochemické metody (Western blot, imunohistochemie, Real Time qPCR). Diskuse dosažených výsledků je detailní a obsáhlá. Autorka dává do souvislostí získané výsledky a současné publikované poznatky. Na základě shromážděných informací vyslovuje vlastní hypotézy.

K formální stránce práce mám pár připomínek. Autorka v disertační práci správně uvádí a diskutuje pouze výsledky, na kterých se sama podílela (viz „List of all publications“). V kapitole „Results“ však chybí část výsledků, na kterých se autorka podle výčtu podílela, a také je v disertační práci diskutuje. Jedná se o behaviorální pokusy v modelu podvázání míšního nervu. V popisu metody imunohistochemie (kapitola 4.4) mě překvapilo promývání řezů mezi primárními a sekundárními protilátkami neředěným sérem. Samotné blokování řezu bylo provedeno pomocí roztoku s 3% sérem, inkubace s protilátkami v roztoku s 1% sérem, čekala bych promývání řezů roztokem bez séra či s podílem séra nikoliv neředěným sérem. Protein integrin  $\alpha$ M je znám pod několika různými názvy. Autorka používá prakticky v celé

práci přednostně označení cluster determinant 11b (CD11b), pouze v části věnované vlivu losartanu v modelu podvázání míšního nervu označuje protein zkratkou OX42. Podle mého názoru by bylo vhodné v celé práci použít jednotné značení proteinu. V kapitole „Methods“ je uveden soupis použitých metod. Autorka se v disertační práci věnuje čtyřem oblastem studia mechanismů vzniku neuropatické bolesti. Zvýšení přehlednosti by asi prospělo zařazení schématu, jak byly jednotlivé skupiny zvířat ovlivněny a které metody byly použity při studiu určitého tématu. Drobným nedostatkem je různé rozpětí ypsilonových os v obrázku 5.11.

Neuropatická bolest v klinické praxi představuje stále obtížně léčitelnou bolest. Výsledky uvedené v předložené disertační práci jasně prokazují zapojení imunitních reakcí do procesů vzniku neuropatické bolesti. Ovlivnění imunitní a neuroimunitní odpovědi se zdá být slibnou možností v léčbě neuropatické bolesti. Dalším poznatkem je též nezanedbatelný příspěvek aktivace TRPV1 ke vzniku neuropatické bolesti. I modulace aktivity TRPV1 by mohla přispět k potlačení neuropatické bolesti. Vysokou kvalitu vědecké práce autorky prokazuje publikování výsledků v mezinárodních vědeckých časopisech. Mgr. Kalynovská je hlavní autorkou dvou publikací a spoluautorkou jedné publikace. Další publikace je zatím v recenzním řízení.

#### Dotazy

1) Mohla byste prosím upřesnit hodnocení výsledků imunohistochemie v kapitole 4.4? Infiltraci makrofágů do spinálních ganglií nebo zadních rohů míchy jste detekovala pomocí protilátky proti CD68. Plochu CD68-pozitivních těl buněk (IR) jste vztáhla k ploše (ROI) spinálního ganglia nebo zadního míšního rohu (IR/ROI) a výsledek vyjádřila jako procenta (IR%). Opticky je na obrázku 5.1 plocha CD68-pozitivních buněk v poměru k celkové ploše ROI vyšší než v grafu uvedených 2,5%.

2) Ve své práci v úvodu píšete o možné aktivaci mikroglií vazbou paclitaxelu na Toll-like receptor 4 (TLR4). V diskusi popisujete senzitivizaci TRPV1 v zadních míšních rozích paclitaxelem pravděpodobně přes aktivaci TLR4 na presynaptických zakončeních neuronů míšních ganglií. TLR4 jsou součástí vrozené imunitní odpovědi a vyskytují se zejména v makrofázích. O interakci paclitaxelu a makrofágů se nezmiňujete, přitom ve vašich experimentech makrofágy hrály roli ve vzniku neuropatické bolesti. Jsou známy informace o vlivu paclitaxelu na makrofágy přes TLR4 a případně rozdíly v mechanismu působení takto ovlivněných makrofágů ve vzniku neuropatické bolesti?

3) Důležitou molekulou ve vašem výzkumu je chemokín CCL2. Píšete o něm zejména jako o chemoatraktantu makrofágů. Zmiňujete se též o produkci prozánětlivých markerů po aktivaci

mikroglíí a makrofágů CCL2. Samotný CCL2 řadíte k prozánětlivým markerům. Přesto jste tento chemokin nezařadila ani k jednomu fenotypu makrofágů. Jak je to tedy s jeho schopností polarizace makrofágů a mikroglíí do M1 či M2 fenotypu?

V předložené disertační práci Mgr. Kalynovská prokázala, že je schopna samostatně řešit komplexní vědeckou problematiku, splnit vytyčené cíle a dosažené výsledky úspěšně publikovat. Závěrem mohu doporučit udělit Mgr. Kalynovské akademickou hodnost Ph.D.

V Praze, dne 27. září 2018

RNDr. Lucie Hejnová, Ph.D.  
Katedra fyziologie, PřF UK