POSUDEK DISERTAČNÍ PRÁCE

„STUDIE O ÚČINKU IVERMEKTINU NA PURINERGNÍ $P2X_4$ RECEPTOR“

Autor disertace: Ing. **Irena Jelínková**

Autor posudku: Doc. MUDr. František Šťastný, C.Sc.

Předložená disertační práce, vypracovaná ve Fyziologického ústavu AV ČR pod odborným vedením Ing. J. Teisingera a RNDr. H. Zemkové, poskytuje na 86 textových stranách ucelenou informaci o současném stavu našeho nazírání na strukturu a funkci purinových receptorů spřažených s iontovým kanálem. Po formální stránce předložená disertace splňuje základní požadavky kladené na tento typ přehledného zpracování dosažených výsledků pro potřebu odborné disertační práce. Textovou část dokumentuje 23 obrázků a 6 tabulek, které provází jejich méně obvyklé číslování. Zvláštní pozornost práce věnuje sedmi podjednotkám P2X receptoru, především pak podjednotce $PX2_4$. Homo- nebo hetero-trimerní uspořádání P2X podjednotek do struktury komplexu purinový receptor/iontový kanál aktivovaného ATP. Vlastní iontový kanál je přednostně propustný pro mono- a divalentní ionty v poměru $pCa^{2+}/pNa^{+} \sim 4$. Receptorový komplex $P2X_4$ se však na rozdíl od dalších P2X receptorů tvořených zbývajícími 6 podjednotkami vyznačuje přítomností zvláštního modulačního místa, do kterého se specificky váže glykosid ivermektin či invermektin (IVM), látka používaná jako antihelmintikum především u filariálních nákaz.

Hlavními cíli disertační práce, které jsou jasně definovány jako 3 úkoly disertace, se stala charakteristika vazebného místa pro IVM, jeho aminokyselinová sekvence a vytypováním významných aminokyselin pro vazbu IVM jako modulátoru a ATP jako agonisty $PX2_4$ receptoru. Protože autorka neuvádí žádné aplikační výstupy či možnost „patentové“ ochrany získaných výsledků, spatřuji hlavní význam autorčiny práce v tom, že rozšiřuje naše poznání v oblasti obecné charakteristiky jednoho v savčích buňkách nejčastěji exprimovaného P2X receptoru. Výsledky mají predikovatelný výstup či další využití v oblasti regulace krevní mikrocirkulace, ale i v oblasti patofyziologie bolesti. Považuji proto zvolené téma za aktuální a z hlediska metodického přístupu vysoce perspektivní.

Jednostránkovou úvodní část disertace provází obsažný, 28stránkový literární přehled. Ten umožňuje čtenáři si vytvořit ucelený přehled o P2X receptorech. Při porovnávání jednotlivých modelů P3X receptoru (Freistův, Yanův a Evansův model) by však názornosti prospělo jejich obrazové schéma (str. 11-12). Dále mám k literárnímu přehledu následující dotazy: (1) co znamená „…glutamátového receptoru (typu 6)…“ (viz. str. 17, 7. ř. zdola)., (2) co se míní označením „…oxidované ATP,…“ (viz str. 20, 14. ř. shora) a (3) jaké jsou „fyziologické“ koncentrace ATP a „farmakologické“ koncentrace IVM v biologických tekutinách, případně v jakém vztahu jsou k používaným koncentracím uvedeným v literárním přehledu nebo ve vlastních pozorováních (postrádal jsem tuto informaci i v části „Diskuze“). Současně upozorňuji na následující terminologické omyly: (a) nikoliv „…cerebrálních“ Purkyňových buněk..“, ale správně „…cerebelárních Purkyňových buněk…“ (viz str. 22, 9. ř. shora) a (b) nikoliv „…v parasympatetické aktivaci…“, ale správně „… v parasympatické aktivaci…“ (viz str. 22, 18. ř. shora).

Část „Materiál a metody“ obsahuje dostatečně názorný popis použitých metod zahrnující jak postupy při kultivaci HEK293 buněk, tak i při práci s vektorem použitým při jejich transfekci a zahrnuje i genetickou kontrolu provedených 46 mutací genu *P2X₄* (!!) vnesených do jejich genomu. V další práci s mutovanými HEK293 buňkami autorka úspěšně využila dlouholeté zkušenosti laboratoře s měřením proudových odpovědí technikou „patch-clamp“. Ke statistickému zpracování získaných dat použila vhodných počítačových programů. I k této části však mám dvě otázky, neboť jsem na ně nenalezl potřebné odpovědi či vysvětlení: (1) exprimují kultivované HEK293 buňky ve svých membránových površích exo-ATPázu a (2) v jaké formě bylo použité ATP (jako 2-MeSATP nebo jako „free“ ATP či jako Na-sůl)?

Těžiště práce tvoří 26 stran výsledkové části, ve které jsou výstižně popsána dílčí zjištění, která dostatečně názorně doprovázejí obrázky a tabulky, včetně znázorněného prostorového uspořádání TM1 a TM2. Skutečnost, že na několika místech výsledkové části disertace je uvedeno, že získaná data jsou v souladu s literárními údaji, působí rušivěji než bezprostřední konfrontace získaných dat s modely TM1 a TM2.

Osmistránková diskuze věcně a kriticky hodnotí získané údaje jak ve vztahu k modulačnímu místu pro IVM, tak i pro rekogniční místo, do kterého se váže ATP jako agonista $P2X_4$. V závěru pak autorka shrnuje dosažené výsledky do 6 bodů, v nichž uzavírá, že pro modulační účinek IVM na $P2X_4$ mají zásadní význam obě transmembránové domény

receptoru a 13 aminokyselinových zbytků ektodomény v části přiléhají TM1. Dále na extracelulární doméně receptoru vytipovala 3 důležité aminokyselinové zbytky, které mají význam pro vazbu ATP do vazebného místa pro agonistu.

Disertaci uzavírá seznam použité literatury, zahrnující 144 odkazů, z nich 2 práce se mi nepodařilo dohledat v textu (Rohrer et al., 1992; Royle et al., 2002) a naopak práce Zhoe-ho nebyla v seznamu literatury uvedena.

ZÁVĚR. Není pochyb o tom, že autorka svými původními nálezy významně přispěla k našemu lepšímu chápání purinergní neurotransmise a to především ve vztahu k $P2X_4$ receptoru. Svá zjištění shrnula ve dvou publikacích (jedné z nich je prvním autorem) otištěných v prestižních časopisech s IF a je spoluautorkou dvou dalších publikací (s IF) týkajících se podobných otázek jako v případě P2X, zaměřených však na MT2 typ melatoninového receptoru. Předložená disertační práce je uceleným souborem molekulárně biochemických zjištění, která se stávají podnětem pro další studium purinergní transmise, od něhož lze očekávat lepší pochopení patofyziologie tohoto mediátorového systému a následně i kauzálně zaměřeného farmakologického (a terapeutického) využití. Předložená disertační práce je po obsahové i formální stránce zpracována velmi kvalitně a plně odpovídá požadavkům kladeným na disertační práci tohoto typu. Ing. Irena Jelínková jako postgraduální studentka oboru biochemie a patobiochemie v ní prokázala schopnost samostatné vědecké práce, a proto navrhuji jmenované udělit vědeckou hodnost doktor filosofie (Ph.D).

Vypracováno v Praze 21. ledna 2008

Doc. MUDr. František Šťastný, CSc.

Psychiatrické centrum Praha,
Ústavní 91
181 03 Praha 8
(e-mail: stastny@pcp.lf3.cuni.cz)