

Posudek na doktorandskou disertační práci Ing. Pavly Hubálkové nazvanou
STUDIUM FUNČNÍCH A FARMAKOLOGICKÝCH VLASTNOSTÍ NMDA
RECEPTORŮ

Předložená disertační práce Ing. Hubálkové zaměřená na zkoumání NMDA receptorů a jejich funkčních a farmakologických vlastností za různých experimentálních podmínek byla vypracována na základě výsledků získaných v průběhu jejího doktorandského studia na Fyziologickém ústavu AV ČR, v.v.i. v Praze. Vlastní disertační práce je založena na výsledcích pěti publikací v prestižních mezinárodních časopisech (J. Neurosci., IF 5.673, 2x J. Med. Chem., IF 6.205, Front. Pharmacol., IF 4.225 a Steroids, IF 1.947), které vznikly ve spolupráci s Ústavem organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i. Kopie těchto spoluautorských článků jsou in extenso přiloženy k disertační práci. Kromě toho se autorka podílela na dalších čtyřech publikovaných člancích.

Téma disertační práce souvisí s výzkumem vlastností a modulací funkce ionotropních glutamátových receptorů, které zajišťují rychlý v CNS a hrají důležitou úlohu v synaptické plasticitě a procesech učení. Vlastní práce je napsána přehledným a velmi dobře srozumitelným způsobem, prakticky bez chyb a překlepů. V úvodní teoretické části (36 stran) autorka shromáždila aktuální informace týkající se struktury a funkce NMDA receptorů, včetně zmínky o jejich zapojení v některých patologiích nervové soustavy a přehledu farmakologie těchto receptorů s důrazem na alosterické modulátory, včetně neurosteroidů.

Výsledky jednotlivých prací jsou souhrnně představeny celkem na 17 stranách s použitím 16 grafů a 14 tabulek, a jsou pak podrobně diskutovány (celkem 12 stran) s ohledem na současné poznatky v této oblasti. Závěrečné shrnutí poskytuje přehled hlavních získaných výsledků a na úplný závěr se autorka pokusila zhodnotit celkový význam své práce z důrazem na perspektivu možného terapeutického využití neurosteroidů jako alosterických modulátorů NMDA receptorů.

Práce jednoznačně splnila svůj účel a podařilo se dosáhnout vytčených cílů. Jak sama autorka správně uvádí, její disertační práce přinesla řadu nových poznatků o vztahu mezi strukturou a potenciačním nebo inhibičním účinkem neurosteroidů na NMDA receptory. Tyto informace mají význam nejen pro pochopení funkce a signalizace zprostředkované NMDA receptory, ale mohou být užitečné také pro hledání nových potenciálních léčiv. Mezi důležitá a velmi zajímavá zjištění patří mj. odhalení vlivu Ca^{2+} iontů na inhibiční působení neurosteroidů na NMDA receptory a souvislost mezi Ca^{2+} indukovanou depalmitoylací CTD GluN2B podjednotky tohoto receptoru a zvýšením jeho citlivosti k inhibičním neurotransmiterům. Tento fenomén může být považován za významný molekulární mechanismus bránící nadměrnému vstupu Ca^{2+} iontů do buňky. Kromě toho se autorce také podařilo popsat určitý vztah mezi strukturou potenciačních neurosteroidů a jejich schopností modulovat funkci NMDA receptorů, přičemž se ukázalo, že potenciační účinek těchto látek je závislý na délce C3-hemiesterového zbytku v kombinaci se substituentem na uhlíku C17. Byly identifikovány výchozí strukturální determinanty neurosteroidů vhodné pro další studium těchto biologicky aktivních látek důležitých pro potenciální modulaci NMDA receptorů.

Otázky k obhajobě:

1. V úvodní části (str. 16) je uvedeno, že mobilita NMDA receptorů obsahujících GluN2B podjednotku je vyšší než u receptorů s podjednotkou GluN2A. Existuje nějaká souvislost mezi mobilitou a funkcí NMDA receptoru nebo obecně mezi mobilitou iontových kanálů v buněčné membráně a jejich funkcí? Na téže straně je uvedeno, že NMDA receptory s GluN2B podjednotkou jsou na synapsích lokalizovány po kratší dobu. Jaký je asi obrat (poločas) NMDA receptorů na synapsi a jakými faktory může být ovlivněn?
2. V popisu metody přípravy primárních hipokampálních neuronů (str. 44) se uvádí, že „...na vrstvu astrocytárních neuronů byly nasazeny hipokampální neurony izolované z 1-denních krysí mláďat Wistar...“. Mohla byste objasnit, co znamená termín „astrocytární neurony“ a detailněji popsat, jak vlastně byly primární neurony izolovány? Proč byly neurony izolovány z hipokampu a ne z jiné části mozku? K jakým pokusům byly primární hipokampální neurony použity?
3. Při provádění většiny pokusů, jako např. měření proudových odpovědí NMDA receptorů pomocí metody terčíkového zámku, byly testované neurosteroidy zpravidla přidávány k buňkám akutně. V některých případech byl také zkoumán možný cytotoxický vliv neurosteroidů, ale výsledkům těchto experimentů není ve vlastní disertační práci věnována příliš velká pozornost. Bylo by možné komentovat případné negativní působení těchto látek na viabilitu buněk a možný mechanismus vyvolaného poškození buněk?
4. Mohla byste prosím kriticky zhodnotit možnosti terapeutického využití neurosteroidů působících na NMDA receptory? Jakým způsobem by tyto látky mohly/měly být aplikovány v in vivo podmínkách (vzhledem k jejich chemickým vlastnostem a stabilitě)? Jak významná je potenciální interference neuroaktivních steroidů s jinými receptory? Je něco známo o možných vedlejších (nežádoucích) účincích těchto látek na organismus?

Ing. Hubálková sepsáním své práce prokázala, že se výborně orientuje ve studované problematice a získané výsledky je schopna náležitým způsobem zpracovat. V rámci své experimentální práce autorka musela prakticky zvládnout řadu náročných technik, od molekulárně biologických a biochemických metod až po elektrofyziologická měření funkce iontových kanálů. Vzhledem k těmto skutečnostem a celkově vynikající úrovni disertační práce splňující veškeré požadavky kladené na tento typ práce doporučuji, aby Ing. Hubálkové byl po úspěšné obhajobě udělen titul Ph.D.

V Praze 1.9.2021



Doc. RNDr. Jiří Novotný, DSc.
Katedra fyziologie
Přírodovědecká fakulta UK