

Oponentský posudek na doktorandskou disertační práci „Sledování vlivu stresu a účinku psychotropik na hladiny podjednotek trimerních G proteinů a buněčné funkce *in vitro* a *in vivo* v kontextu depresivních onemocnění“.

Autor práce: MUDr Marek Páv

Disertační práce MUDr Marka Páva se skládá ze dvou částí. V první sleduje vliv imobilizačního stresu a *in vivo* selektivní inhibice dopaminergních D2 receptorů sulpiridem a neselektivní inhibice α -adrenergních receptorů fentolaminem na koncentrace vybraných α -podjednotek (Gai, Gas, Gaq) a podjednotky β heterotrimerických G-proteinů v buněčných membránách z mozku myši a mononukleárních buněk izolovaných ze sleziny. V pokusech *in vitro* sleduje funkční vlastnosti mononukleárních buněk, izolovaných ze sleziny (cytotoxickou aktivitu buněk „natural killer“ a uvolňování cytokinů interleukin-2 (IL-2), interleukin-4 (IL-4), tumor necrosis factor- α (TNF- α) a interferon- γ (INT- γ)). V druhé části práce zkoumá akutní a chronický vliv antidepresiv s různým mechanismem účinku (tricyklická antidepresiva jako nescifické inhibitory vychytávání aminových mediátorů, specifické inhibitory přenašeče pro serotonin, blokátory serotoninových a α_2 -adrenergních receptorů a inhibitor monoaminooxidázy) na expresi vybraných α -podjednotek a podjednotky β v buněčných membránách izolovaných z buněk potkaní gliomové linie C6 *in vitro* a chronický vliv vybraných antidepresiv po podávání *in vivo* na tyto proteiny v membránách připravených z mozku, sleziny a brzlíku laboratorního potkana.

Práce je předkládána *in extenso*. Vychází z experimentálních výsledků publikovaných v impaktovaných časopisech Journal of Neuroimmunology (Fišerová A., Starec M., Páv M. et al., 2002) a Neuroendocrinology Letters (Páv M., Kovářů H., Kovářů F. et al., 2009). Hlavními nálezy první části práce jsou imobilizačním stresem vyvolané zvýšení koncentrací podjednotek heterotrimerických G-proteinů Gas a Gaq v membránách z celého mozku a v membránách izolovaných z mononukleárních buněk ze sleziny a podobný profil jejich ovlivnění podáním inhibitorů dopaminergních D2 a α -adrenergních receptorů. Ve funkčních pokusech to je inhibice cytotoxické aktivity buněk „natural killer“ u stresovaných zvířat, kterou podání fentolaminu snižuje kdežto podání sulpiridu jí zabraňuje. Účinek fentolaminu je smyslem podobný u stresovaných i nestresovaných zvířat (tj. zvýšení cytotoxické aktivity při srovnání s příslušnými kontrolami), zatímco sulpirid u nestresovaných zvířat cytotoxickou aktivitu snižuje kdežto u stresovaných zvířat výrazně zvyšuje. Dále je to stresem vyvolané snížení uvolňování cytokinů IL-2 a IL-4 a zvýšení uvolňování TNF- α z mononukleárních buněk izolovaných ze sleziny a různé ovlivnění uvolňování IL-2, IL-4, INF γ a TNF- α podáním fentolaminu a sulpiridu *in vivo*. Druhá část práce přináší zjištění, že inkubace gliomových buněk C6 po dobu 24 h (akutní působení) nebo 120 h (chronické působení) v přítomnosti testovaných látek má na koncentrace podjednotek Gaq, Gas a Gai stejný nebo podobný účinek u imipraminu (nemá žádný vliv), citalopramu, sertralinu mirtazapinu a moclobemidu (nemá žádný vliv). U fluoxetinu nachází snížení Gaq u akutního kdežto zvýšení u chronického působení a u mianserinu zvýšení Gaq u akutního působení, které mizí u chronického působení. Chronické podávání citalopramu a moclobemidu laboratorním potkanům vyvolává zvýšení Gas a Gai v mozkových membránách. V případě citalopramu je tento účinek podobný akutnímu i chronickému účinku *in vitro* u buněk C6 kdežto moclobemid *in vitro* žádný účinek nemá. Stejný účinek jako v mozku má citalopram i v membránách z celé sleziny, ale ne v membránách z celého brzlíku.

Výsledky první série pokusů prokazují účast dopaminergní signalizace na imobilizačním stresem vyvolaných změnách koncentrací proteinů, které se účastní přenosu signálu na membránách izolovaných z mozku a bílých krvinek ze sleziny. Dále prokazují vliv


dopaminergní signalizace na funkci (uvolňování cytokinů, cytotoxická aktivita) bílých krvinek izolovaných ze sleziny. Výsledky druhé série pomocí pokusů *in vitro* na gliomových buňkách ukazují na nový mechanismus účinku specifických inhibitorů serotoninového přenašeče fluoxetinu, citalopramu a sertralínu a antagonisty adrenergních a serotonergních receptorů mirtazapinu na koncentraci podjednotek G-proteinů. Mechanismus patrně nesouvisí s bloádou aminových přenašečů, protože tricyklická antidepresiva žádné účinky nevykazují, či zvýšením hladiny neuromediátorů, neboť buňky C6 mediátory nesyntetizují a neuvolňují a inhibitor monoaminoxidázy rovněž nemá účinek. Citalopramu po chronickém podávání potkanům *in vivo* má účinek vykazující obdobný profil změn exprese membránových G α s a G α i podjednotek v mozkové kůře a slezině, ale ne v brzlíku. V souvislosti s těmito výsledky je zajímavé, že analog mirtazapinu mianserin nemá *in vitro* žádný účinek a že moclobemid, ačkoliv *in vitro* nemá žádný účinek, má *in vivo* smyslem i velikostí stejný účinek jako citalopram.

Vlastní text disertační práce má 103 stránek. Úvod, který zahrnuje i 5 schematických obrázků a 4 tabulky, má celkem 48 stránek. Metody jsou popsány na 11 stránkách. Výsledky, které zahrnují 18 výsledkových grafů, jsou popsány na 17 stránkách, a diskuse na 27 stránkách. Text obsahuje více než 700 citací. Celý text trpí špatnou srozumitelností, která je způsobena množstvím překlepů, používáním zkratk, které nejsou definovány v seznamu zkratk, používáním slangu a vět, které působí dojmem doslovného překladu z anglického originálu včetně slovosledu a tudíž nemají logickou českou stavbu. Dalším důvodem obtížné srozumitelnosti je rozvláčnost celého textu, který navíc nepříliš dobře rozlišuje mezi úvodem, metodami, výsledky a diskusí. Podle mého názoru by srozumitelnosti disertační práce prospělo výrazné zkrácení nebo i úplné vynechání částí, které se netýkají přímo experimentální práce a interpretace výsledků (například v úvodu vypisování kritérií diagnostických znaků depresivní epizody) a srozumitelnější vyjádření výsledků. Ohromné množství citací a rozebírání hypotéz, které s vlastní experimentální prací souvisí jen velmi volně, působí dojmem řešení ohromného množství problémů, ve kterém zanikají vlastní zajímavé výsledky.

Závěr:

Disertační práce přináší zajímavé výsledky, které jsou důležité pro odhalování patofysiologických změn při vzniku deprese, a objasňování mechanismů účinku látek, které jsou používány při léčbě deprese. Její slabou stránkou je, že je napsána jen velmi těžko srozumitelným, nepečlivým a zbytečně mnohomluvným způsobem. Výsledky pokusů a jejich interpretace však byly otištěny v impaktovaných mezinárodních časopisech po oponentuře nezávislými odborníky v dané oblasti. Potvrzuje to předpoklady autora pro samostatnou tvořivou práci a udělení titulu PhD. Vzhledem k tomu doporučuji její obhájení.

14.11.2010


MUDr Vladimír Doležal, DrSc