

Posudek na disertační práci

Název disertační práce: *Calcium homeostasis and modulation of nociceptive synaptic transmission*

Autor: Mgr. David Sojka
Vedoucí disertační práce: MUDr. Jiří Paleček, PhD.
Oddělení funkční morfologie
Fyziologický ústav AV ČR

Předložená studie má celkem 149 stran včetně literatury; neobsahuje přílohy.

Cíle práce jsou formulovány do čtyř bodů: i) Kvantifikovat změny exprese tří kalcium vázajících proteinů, parvalbuminu (PV), calbindinu (CB) a calretininu (CR) v zadních rozích míšních a v neuronech spinothalamického traktu (STT), po experimentálně navozeném periferním zánětu. ii) Popsat koncentrační změny vápenatých iontů v průběhu synaptického přenosu v neuronech zadního rohu míšního na řezech míchy. iii) Farmakologicky charakterizovat tyto změny koncentrace vápenatých iontů vyvolané stimulací zadních kořenů míšních. iv) Vypracovat model centrální senzitivace *in vitro* s použitím kapsaicinu, jako stimulatoru primárních aferentů.

Rozsáhlý literární přehled (52 stran) je vhodně doplněn obrázky a tabulkami. První kapitola je věnována terminologii související s bolestí a signálními drahami nocicepce. Druhá kapitola se zabývá synaptickým přenosem nociceptivního signálu a přináší poznatky o aktivaci a modulaci ionotropních a metabotropních glutamátových receptorů. Samostatná podkapitola je věnována úloze glie v synaptickém přenosu. Kapitola Modulace synaptického přenosu na úrovni páteřní míchy je po úvodní podkapitole zaměřena na centrální sensitizaci, která je jedním z významných mechanismů vzniku chronických bolestivých stavů a je centrem pozornosti této práce. Význam intracelulární vápníkové signalizace, jeho rezervoáry a mechanismy uvolňování v neuronech, jsou předmětem poslední, čtvrté kapitoly. Literární přehled přináší komplexní informace k experimentální části.

Stanovené cíle práce byly splněny a odpovídá jim i širě použitých metodických přístupů

i) U zvířat s jednostranně navozeným artritickým zánětem kolenního kloubu (model chronické bolesti) byly v lumbální oblasti míchy analyzovány změny exprese tří vybraných kalcium vázajících proteinů metodami imunohistochemie, denzitometrie a Western blotingu. Byl zjištěn pokles PV v ipsilaterálním rohu míšním vzhledem k vyvolané artritidě a nárůst exprese PV a CB v neuronech STT. ii) V řezech ze spinální míchy (L 3-5) *in vitro* byly po elektrické stimulaci zadního kořene, měřeny přechodné změny koncentrace vápníkových iontů v neuronech zadních rohu míšních pomocí konfokální mikroskopie a kalcium senzitivní fluorescenční sondy (Fluo-4). Byla vyloučena nespecifická přímá elektrická aktivace neuronů v zadních rozích a ověřena reprodukovatelnost i stabilita získaného vápníkového signálu. Významným přínosem práce byl původní nálezy rychlé a pomalé odpovědi ve změnách IC koncentrace Ca^{++} . iii) Byla provedena farmakologická charakterizace změn v koncentracích Ca^{++} během synaptické aktivity v neuronech zadních rohů míšních v závislosti na stimulaci zadního kořene. Byly testovány oba typy odpovědi. iv) Byl vyvinout model centrální senzitivace *in vitro* s použitím kapsaicinu, jako stimulatoru primárních aferentů

Závěrečné hodnocení

Předložená práce zahrnuje vývoj metody, která umožňuje studovat mechanismy centrální senzitivace *in vitro*. Na tomto modelu jsou měřeny změny koncentrace Ca^{++} v závislosti na stimulaci zadního kořene míšního. Byly nalezeny dva odlišné typy Ca odpovědi. Rychlý typ odpovědi je vyvolán aktivací ionotropních glutamátových receptorů a následně napětově závislých vápníkových kanálů a je synchronizován s elektrickou stimulací. Druhý, pomalý typ odpovědi nebyl u tohoto typu neuronů dosud popsán. Autor farmakologicky prokazuje majoritní úlohu Ca^{++} uvolněných z ER v tomto typu odpovědi a diskutuje ji v souvislosti s aktivací metabotropních drah. Autor uvažuje o takto uvolněných Ca^{++} jako o možném významném spouštěcím signálu neuronální senzitivace v míše, který by se mohl podílet na vzniku některých typů chronických bolestivých stavů. Na tyto nálezy pak logicky navazuje studie exprese kalcium vázajících proteinů v STT neuronech.

Připomínky a otázky

Práce je psaná v anglickém jazyce, čtivou a přehlednou formou a mám k ní tuto připomínku: Všeobecně platí, že legendy k obrázkům a tabulkám jsou neúplné, někdy schází a často chybí citace. Formální nedostatky zpracování předložené práce jsou bohužel v rozporu s kvalitou, jak metodického přístupu, tak získaných výsledků. Tato připomínka má pouze formální charakter a nijak nesnižuje hodnotu celé práce.

Následující dvě připomínky se týkají předepsané formální stránky práce a je nutné v práci doplnit před uložením do knihovny: i) V práci schází seznam zkratk ii) Některé citace monografií jsou neúplné

K práci mám následující tři otázky: i) V čem vidíte vzájemné výhody a nevýhody metod „calcium imaging“ v řezech a „patch clamp“? ii) Vysvětlíte prosím pojmy „area“ a „intenzity“ v obrázku 21 výsledkové části. Pokud area v prvním sloupci je tatáž hodnota jako ve jmenovateli třetího sloupce, tak mi třetí sloupec nedává dobrý smysl. iii) Ve výsledcích uvádíte snížení exprese PV v zadních rozích míšních pod vlivem periferního zánětu (imunohistochemické analýzy) a ve shodě s tím jsou výsledky Western blotingu. Jak hodnotíte v tomto kontextu naopak zvýšenou kolokalizaci PV s neurony STT?

Předkládaná práce je objemnou a komplexní studií, kde autor velmi dobře zvládl několik moderních metodických přístupů, prokázal schopnost výsledky zpracovat, kriticky je hodnotit v kontextu s literárními údaji a vyvozovat patřičné závěry. Práce přináší významné originální nálezy. Část výsledků byla již publikována v impaktovaných časopisech, další část je v recenzním řízení. Tím splňuje požadavky, kladené na disertační práci a doporučuji ji přijmout jako podklad k dalšímu řízení k získání titulu Ph.D.

V Praze dne 30.8.2010

RNDr. Jitka Žurmanová, Ph.D.
Katedra fyziologie živočichů
Přírodovědecká fakulta
Univerzita Karlova v Praze

