

Oponentský posudek na dizertační práci

Difúzní parametry mozkové tkáně při ischemii a v průběhu status epilepticus

Autor dizertační práce: **MUDr.Karel Šlais**

Školitel práce: prof.MUDr.Eva Syková, DrSc.

Pracoviště: Ústav experimentální medicíny AVČR, v.v.i.

Doktorský studijní program v biomedicíně Univerzity Karlovy v Praze

Obor: Neurovědy

1. Všeobecná charakteristika

Předložená dizertační práce se zabývá měřením difúzních parametrů a extracelulární koncentrací energetických metabolitů a glutamátu u vybraných modelů patologických stavů (fokální hypoxie-ischemie, globální hypoxie-ischemie, status epilepticus) u laboratorního potkana, u kterých lze předpokládat výrazné změny ve velikosti extracelulárního prostoru. ***Téma práce je velmi aktuální*** a rozhodně rozvíjí poznatky a samotný obor neurovědy. Do výsledkové části jsou vhodně vloženy **3 práce autora publikované v renomovaných časopisech s impakt faktorem** (Neuroscience Letters, Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism, Experimental Neurology). Pro studium extracelulárního prostoru a difúzních parametrů mozkové tkáně byly použity moderní metody založené na použití iontově selektivních mikroelektrod a difúzně vážené magnetické rezonance, které tým školitelského pracoviště rutinně používá. Výsledkem práce je detailní časový popis změn jak extracelulárního prostoru, difúzních parametrů, ale i koncentrací významných látek (glutamát, glukóza, laktát, pyruvát) v průběhu a těsně po mozkové hypoxii-ischemii a epileptickém statu vyvolávaným pilokarpinem u anestezovaných laboratorních potkanů dospělého věku.

Formálně má práce formu klasické disertační práce se všemi náležitostmi: úvodem, popisem současného stavu problematiky, definováním cílů práce, metodikou, výsledky, diskuzí, závěrem, použitými literárními prameny a seznamem publikací autora. Práce obsahuje 101 stran textu, 11 obrázků, 1 tabulku a 3 kopie primárních publikací autora.

2. Hodnocení práce

Práce potvrzuje dobrou orientaci autora v problematice extracelulárního prostoru mozku a jeho změn, má přehledné uspořádání a objemově i časově rozsáhlý přehled literatury. Použitá ***metodika práce je plně relevantní***, autor velmi dobře využil stávajících metod, které tým školitelského pracoviště rutinně používá. Výsledky jsou uváděny velmi střizlivě, také grafická dokumentace je velmi hezky a přehledně uspořádaná. ***Práce je svou tematikou i zvolenými postupy velmi přínosná, protože popisuje procesy, které významně zasahují do patofyziologie výše uvedených patologií.***

Jak jsem již uvedl práce se zabývá třemi experimentálními modely patologických stavů a pravděpodobně z tohoto důvodu je úvod i diskuze k jednotlivým patologiím velmi chudá. Osobně bych doporučil ***zaměřit se na jednu patologii***, protože takto nehomogenní skupina (fokální ischemie-hypoxie, globální hypoxie ischemie, status epilepticus) má řadu rozdílných

patofyziologických mechanismů, které pak nelze snadno diskutovat dokonce ani z hlediska extracelulárního prostoru. Vzhledem k mé odborné specializaci tzn. experimentální epileptologie se dále zaměřím především na pilokarpinem vyvolaný status epilepticus. Autor se zabývá extracelulárním prostorem (ECS) a případnými vlivy na změnu koncentrace látek v ECS. Proto velmi *postrádám v úvodu popis udržování transmembránového gradientu Cl^-* v mozku a dysbalanci v průběhu SE, které mohou vést podle moderní teorie až ke ztrátě GABA inhibice. Autor použil pro vyvolání epileptické aktivity či jak uvádí epileptického statu u potkana anestetizovaného uretanem (1.2 g/kg i.p.) cholinergně působící pilokarpin v jedné dávce (300mg/kg i.p.). Nicméně *originální citovaná studie Stringerové (Stringer et al. 1994) popisuje aplikaci 2 dávek* (300mg/kg i.p.) a epileptická aktivita se objevovala 15-20 minut po druhé dávce tj. po 75 až 80min. po první dávce. Ve zmiňované studii jsou také snímány pouze lokální potenciály pole (FP) z hipokampových polí bez neokortexu, což mě nutí se podrobněji zamyslet nad výsledky autora s „epileptickým statem“. Po podání pilokarpinu dochází elektrograficky k rozvoji theta aktivity v hipokampu, která je následována vysokovoltážními výboji, které se již mohou šířit do neocortexu. Nasleduje období rekurentních záchvatů limbického původu, které následně přecházejí ve status epilepticus (SE). Proto mne ve výsledcích velmi překvapil obrázek 8 a 9 kde *není možné snadno rozpoznat fázi rekurentních záchvatů a epileptického statu*. Také *záznam aktivity extracelulárního draslíku má velmi neobvyklý tvar* tj. ostré homole s maximem v místě nejvyšší amplitudy FP. Předpokládal bych, že draslík bude strmě růst do rozvoje epileptického statu kde dosáhne svého maxima a nastane plateau trvajícím po dobu trvání SE, tak jak je to známo u jiných modelů a in vitro experimentů. Tyto diskrepance samozřejmě mohou být vysvětleny použitou anestézií apod. Nicméně naprosto překvapivé jsou pro mne výsledky DW MRI respektive uvedené ukázkové snímky obr. 10, na kterých je viditelně *snížený ADC_W v neocortexu, ale minimální změna v hippocampu*. Toto považuji za velmi významné a tento regionální rozdíl by zasloužil vysvětlení pomocí přímého měření objemové frakce ECS pomocí TMA.

Po formální stránce nemám k práci žádné zásadní připomínky, drobné překlepy, jako např. na str. 51 ($um^{2s^{-1}}$) či str. 74 (záchvatu má být statu) jsou poměrně vzácné a nikterak nesnižují jinak velmi kvalitní zpracování. Doporučil bych jen *více pracovat s publikacemi výsledků z humánních studií*, protože DW MRI je často používaná diagnostická metoda i v periiktálním období.

Pro obhajobu mám následující dotazy:

- Jak jsem již uvedl dříve, domnívám se, že v práci chybí jak obecný popis tak případná diskuze o roli iontů chlóru a jeho přesunech v průběhu epileptického statu. Mohl byste prosím popsat jakými mechanismy se udržuje gradient Cl^- na membráně? Mohl byste prosím vysvětlit co to je reverzní potenciál a jak případná změna distribuce Cl^- v průběhu epileptického statu ovlivní účinek GABA vázící se na $GABA_A$ receptor?
- Můžete prosím vysvětlit co to je paroxysmální depolarizační posun (paroxysmal depolarization shift) ?

- U „epileptického statu“ popisujete zvýšení extracelulární koncentrace glukózy měřené pomocí mikrodialýzy. Vaše vysvětlení pomocí zmenšení extracelulárního prostoru je sice logické a pravděpodobné, ale jen jedno z mnoha a jsem přesvědčen, že jste si toho vědom, nicméně žádné další neuvádíte. Můžete tedy prosím vysvětlit jaký je například vliv aktivace muskariních receptorů na glykogenolýzu?
- Měření ADC_w pomocí DW MRI u pilokarpinem vyvolaného „epileptického statu“ ukazuje signifikantní snížení v neokortexu. Vzhledem k tomu, že pilokarpin vyvolává především limbické záchvaty se sekundární generalizací, bych očekával největší změny v hippocampu. Nicméně z uvedených příkladů se zdá, že zde k dramatickému poklesu nedochází. Můžete prosím, pokud je to technicky možné, uvést data pro hippocampus a případně okomentovat tyto významné regionální rozdíly?
- Čím si vysvětlujete tvar koncentrace extracelulárního draslíku?

3. Závěr:

Přes uvedené připomínky je nutné konstatovat, že předložená dizertační *práce je kvalitní a splňuje všechny podmínky stanovené zákonem. Sledované cíle byly splněny*. Práce prokazuje předpoklady autora k samostatné tvůrčí vědecké práci, jednoznačně **doporučuji k obhajobě** a v případě úspěšného obhájení udělení titulu „PhD“ za jménem.

V Praze dne 26.6.2009

s pozdravem
MUDr. Jakub Otáhal, PhD.