

Posudek na disertační práci k udělení titulu Ph.D.

**Changes of the Extracellular Space Diffusion Parameters during Acute Pathological States in the Rodent Brain and the Role of AQP4 Channels in Cell Swelling**

autorka: Lesia Dmytrenko, MSc

školitelka: prof. MUDr. Eva Syková, DrSc., FCMA

Práce Lesie Dmytrenko je psaná anglicky dobrou angličtinou. Má 128 stránek textu a velké množství literatury. Celkově má literaturu zpracovanou na 30 stránkách, což je poměrně velmi rozsáhlá část. Práce je také doprovázená originálními separáty, které jsou 3. Jsou to ty, na kterých je založena práce kolegyně Dmytrenko. V první práci je prvním autorem dr. Šlajs, dr. Dmytrenko je spoluautorkou. V další práci je první autorka Yoko Bekku. Ve třetí práci je první autorko Lesia Dmytrenko a týká se její předložené práce. Byla publikována v Plos One. Dizertační práce je velmi dobře dokumentována, má všechny náležitosti vědecké práce, má obsah, má velice důležitý seznam zkratk. Úvod je poměrně rozsáhlý, ale přináší velmi důležité informace o znalostech autorky. Týká se především extracelulárního prostoru v nervovém systému, který má zpracován velice dobře.

Důležitost extracelulárního prostoru je výchozí znalostí pro celou práci. Dále autor zpracovává astrocyty akvaporiny jako vodní kanály. Velmi důležitá je zmínka o regulaci buněčného objemu v astrocytech. Další část přehledu se týká ischemie a status epilepticus. Celá úvodní část práce jak jsem již uvedl, je velmi rozsáhlá a celkově je zpracovávána na 65 stranách, což tvoří téměř polovinu vlastní práce. Ale je předpoklad, že kterékoliv část z tohoto přehledu, může být použita k publikaci v jakémkoliv přehledném časopise zejména také tím, že již je celá práce napsaná anglicky.

Velmi oceňuji schémata, kterými je úvodní část práce doprovázená. Autorka zde velmi přehledně popisuje nálezy z laboratoře prof. Sykové, především velikost extracelulárního prostoru ve vývoji, v dospělosti a také za patologických stavů. To jsou všechno záležitosti, na kterých laboratoř prof. Sykové dlouhodobě pracuje.

Autorka na základě těchto svých studií a schémat si udává cíle své studie. Chybí mně hypotézy. Bohužel autorka si vytkla jenom cíle bez hypotéz. Jsou uvedeny tři cíle; určování změn v extracelulárním prostoru a difúzní parametry během status epilepticus, který byl vyvolán

pilocarpinem, dále také při terminální ischemii a anoxii, která byla vyvolána zástavou srdce. Druhým cílem bylo u modelu status epilepticus bylo objasnit změny lokálních potenciálů a změny extracelulární draslíkové koncentrace a pokusit se ukázat na opravdové základní změny koncentrace kyslíku v mozkových metabolitech, zejména změny laktátu pyruvátu, glukózy a glutamátu v případě porušení některé frakce extracelulárního objemu. Důležitým úkolem byl také výzkumu úlohy  $\alpha$ -syntrophin proteinu na extracelulární difuzní parametry a jejich změny během akutního bobtnání buněk (pučení buněk) a v experimentálních modelech in vivo a také in vitro.

Autorka velmi podrobně rozebírá metodiku. I když si myslím, že tak podrobný popis veškeré techniky iontově selektivních elektrod, již není v současné době nutný. Nutný byl v době, když jej provádělo poměrně málo laboratoří. Z této práce by se mohli čtenáři metodu učit. Velmi podrobně je rozebrána metodologie při určování změny difúze v extracelulárním prostoru. Cením si, že byla použita experimentální magnetická rezonance, což práci posouvá do vysokých hodnot. Dále autorka popisuje měření koeficientů difúze vody. Velmi záslužné je užití mikro dialýzy. To je také poměrně náročná metoda a těžko se provádí na tak malých rozměrech, jaké mají laboratorní potkani. Autorka dále popisuje imunohistochemické změny a jejich metody, kvantifikace barvení u individuálních astrocytů.

Jako animální modely používala pilocarpinem evokovaný status epilepticus a měřila nárůst pučení buněk in vivo a in vitro. Ukázalo se, že v obou modelech se snižovala objemová frakce extracelulárního prostoru a tyto změny byly větší a rychlejší během terminální ischemie a anoxie, než u modelu status epilepticus. Bylo zajímavé, že na začátku epiloformní aktivity se ještě více zvýšila koncentrace draslíku, což samozřejmě mělo vliv na neuronální aktivitu a vznikl první epileptický výboj většinou již 30 minut po injekci pilocarpinu. Dá se tedy uzavřít, že zmenšení extracelulárního prostoru přispívá k zahájení status epilepticus? Cením si, že autoři měřili ještě glukózu, laktát a glutamát. Dalším významným nálezem bylo, že u myši s delecí  $\alpha$ -syntrofinu byly vyšší klidové hodnoty ADCW a alfa, ale žádné další významné hodnoty rozdíly. Je zajímavé, že rychle po vyvolání terminální ischemie nebo anoxie prudce vzrůstá extracelulární draslík a to bylo rychlejší u  $\delta$  než  $\alpha$  negativních myši. Jestliže chybí akvaporinové kanály v perivaskulární oblasti, když je snížený obsah  $\alpha$ -syntrofinu, tak se snižuje tonus buněčného edému a to zejména v závažně patologických stavech. To je spojeno se změněným  $K^+$  transportem. Větší extracelulární objem v klidových podmínkách může být také potencionálně zpomalující faktorem ve vývoji buněčného edému a může být i ochranným faktorem proti rychlému zvýšení

koncentraci i potenciálně neurotoxických látek. Mezi dalšími faktory jsou zmiňovány všechny látky, kterou mohou mít vliv na pohyb a lokální koncentraci neuroaktivních látek a trofických faktorů. To umožňuje nalézt rozsah poškozené oblasti, dále ovlivnit proces hojení a také eventuálně distribuci léčiv. To má praktický význam do budoucna.

První otázka: Probrali jste již některá možná terapeutická využití a jakým směrem se chcete ubírat?

Druhá otázka: Jak by šel obecně ovlivnit buněčný edém? Myslíte si, že vznik buněčného edému má stejný princip, ať se jedná třeba o mozkovou mrtvici nebo o poškození hematoencefalické bariéry; je to tedy stejné?

Závěr: Dizertační práce je napsána velmi dobře, má vynikající úroveň, má výborné publikační parametry tzn. tři práce z toho jednou první autor v impaktovaných časopisech. Dr. Dmytrenko má ještě jednu práci v impaktovaném časopise, která přímo nesouvisí s tématem, ale souvisí s její celkovou publikační aktivitou.

Na základě všech těchto skutečností navrhuji, aby dr. Lesii Dmytrenko byl udělen titul Ph.D. za jménem podle § 47 zákona o Vysokých školách č. 111/1998 Sb.

**Prof. MUDr. Richard Rokyta, DrSc.**