

Oponentský posudek disertační práce

Consequences of early ischemic hippocampal lesion in rats

dr. Adely Mátéffyové

Předkládaná práce dr. Adely Mátéffyové je zaměřena ontogeneticky. Zabývá se experimentálně poměrně zanedbávanému fenoménu – poruchám oběhu krve v CNS během vývoje potkana a funkčním důsledkům (vzniku epileptických záchvatů) spojeným s tímto jevem. These jsou odpovídajícího rozsahu (119 stran) a jsou doplněny technicky i obsahově kvalitními obrázky i tabulkami. Z tohoto rozsahu je 32 stran citací, s výraznou převahou datovaných z let devadesátých, která byla svým způsobem zlatou érou výzkumu ischemického poškození mozku. Práce je psána anglicky.

Rozsáhlá úvodní část 33 stran na jedné straně ukazuje obeznámenost autorky s problematikou a na straně druhé dokumentuje problémy, které vznikají při snaze o přehledné zpracování tak rozsáhlé tematiky jakou bezesporu jsou vaskulární leze mozku navíc ve spojení s ontogenesou na poměrně omezeném prostoru. Tím jsou podle mého názoru způsobeny některé drobné nedostatky a nedůslednosti, které dále uvedu. Možná by bylo prospěšnější, vzhledem k obrovskému rozsahu tématu, více se soustředit na daný konkrétní model fokální ischemie a parametry které autorka sleduje. V této souvislosti bych očekával více o rozvoji léze

K této kapitole si dovoluji uvést několik konkrétnějších připomínek a dotazů, které nic nemění na mém kladném hodnocení celé kapitoly.

Str. 4-5... ischemic stroke in neonates is usually caused by a thromboembolism from ... the placenta. ... Embolie z placenty po vybavení dítěte sice není nemožná (paradoxní embolie), ale předpokládá se, že může vzniknout u dětí se srdečními anomáliemi. Foramen ovale je funkčně uzavřeno s prvními změnami tlaku v plicním oběhu (tedy při prvním nádechu). V těchto souvislostech bylo by vhodné, aby autorka lépe specifikovala období neonatální a perinatální. S tím souvisí problematika nedonošenců, kde se častěji vyskytují periventrikulární infarkty v bílé hmotě.

Autorka sice opakovaně zmiňuje roli mitochondrií např. strany 8 a 13 i dále, ale vzhledem k jejich klíčové roli jak v energetickém metabolismu, tak i buněčné smrti by téměř zasloužily samostatnou podkapitolu.

Stejně tak by autorka měla systematictější definovat mechanismy buněčné smrti a zvláště apoptózy. Kromě toho, že se v jejím rámci aktivují mimo pro také antiapoptotické mechanismy, které pravděpodobně mají určité důsledky pro následnou buněčnou funkci, je jednou z charakteristik i to, že buněčná smrt je na rozdíl od nekrózy (ložiska) u apoptózy difuzní. Toto difuzní rozložení může hrát významnou roli při znovuzapojování penumbry a uvažuje se i o jeho roli při pozdějším vzniku epileptických záchvatů.

Problematika vlivu „oxidative burst“ při zánětu vyvolaném nekrozou je z hlediska penumbry natolik významná, že by zasloužila podrobnější zmínku.

Na straně 24 – 25 je tabulka shrnující výhody a nevýhody některých modelů ischemie. Buďto zde, nebo v souvisejícím textu, by bylo vhodné zmínit, že je poněkud rozdílné, pokud se uzavřou velké tepny a uzavření tepének ve tkáni. U cíleného uzavření ACM ve fototrombotickém modelu byla např. popsána rekanalizace na základě vazodilatace kontrahované svaloviny při tvorbě trombu. Podobně to platí pro neexistenci penumbry u tohoto modelu. Samozřejmě u lézí zaměřených na menší cévy hraje roli i náhodné zasažení cév větších, nebo trombotický uzávěr krevního zásobování striata. Vzhledem k zaměření práce na poškození v oblasti hipokampu bych zde očekával porovnání s neokortexem.

V další části práce si autorka velmi dobře stanovuje cíle práce a klade si zajímavé otázky. V této části by bylo vhodné poněkud více zdůraznit hypotézy, které chtěla testovat.

Metodická část ukazuje pečlivou přípravu i provedení všech experimentů. Zvolená metodika plně odpovídá stanoveným cílům a umožňuje získat odpovídající výsledky.

Mám pouze několik dotazů:

Str 36 byl roztok aplikován rychlostí 1 μ l/5 min, nebo to byl objem, který každý potkan dostal?

Str. 36 ...body temperature... kde byla měřena? Byl systém ohřívání zpětnovazební?

Existuje nějaký popis časového vývoje změn po nějakém zásahu při barvení dle Timma u dospělých a eventuálně u mláďat? Zde jsou to téměř 4 měsíce po zásahu. U popisu hodnocení (str. 43) by bylo vhodné u jednotlivých hodnot důsledně uvádět APL systém a z hlediska přehlednosti možná i použít schématu s naznačením lokalizace hodnocených oblastí.

Je nutné vzít v úvahu, že i behaviorální trénink, může mít nějaký vliv na sprouting – je něco o tom známo z literatury?

Kolik bylo použito zvířat pro jednotlivé experimenty je sice nepřiliš systematicky uváděno i ve výsledcích, ale bylo by možná dobré to lépe uvést v metodické části.

Výsledková část je přehledná a založená z velké části na obrazovém materiálu. Výsledky jsou správně presentovány. Jedná se o nové nálezy, které dobře zapadají do kontextu nálezů dalších autorů. Otevírá se tím prostor i pro další výzkum v oblasti vlivu ischemie na pozdější vznik a rozvoj epileptického onemocnění.

K výsledkové části mám pouze několik dotazů, které nijak nezpochybňují kvalitu nálezů.

Str 57 Morris...: Latency decreased at the same rate ($p < 0.0001$)... byl porovnáván sklon dvou regresních přímk?

Objevila se změna objemu hipokampu vůči hipokampu kontralaterálnímu a kontralaterálního vůči kontrolám?

Obr. 23 proč byl použit neparametrický test?

Obr. 24 One way ANOVA with repeated measures – nebylo uvedeno v metodice. Zde by byla možná vhodnější two way ANOVA with repeated measures, nebo test porovnávající křivky učení jako celek.

Obr. 31 Pokud rozdíl v četnosti nenabývá statistické významnosti, nelze tvrdit, že záchvaty v jedné skupině byly četnější.

Diskuse

V diskusní části jsou kvalitně a přehledně analyzovány výsledky vlastní studie v kontextu se světovým písemnictvím. Autorka spojuje pravidelný výskyt epileptických fenomenů s transienční ischemií vyvolanou aplikací endothelinu-1 do oblasti hipokampu. Hlavně u časných záchvatů je však otázkou role extravaskulárních receptorů. Možné působení těchto receptorů na povrchu glie uvádí i autorka. Popisován je však i vzestup intracelulární hladiny Ca^{2+} v neuronech jako přímá reakce na přítomnost endothelinu. To by mohlo vysvětlovat i četnější výskyt časných záchvatů v tomto modelu než u jiných experimentálních ischemických lezí. I v humánní medicíně (u dospělých) je výskyt epileptických záchvatů těsně po ictu pouze okolo 5% a záchvaty se vyskytují častěji v souvislosti s pozdější konsolidací léze. Hypoxie časného postnatálního období má dlouhodobé důsledky z hlediska vzniku záchvatů. U těchto zvířat jsou popsány i delší epileptické následné výboje. Epileptické záchvaty byly popsány po ICV aplikaci endothelinu, kde je otázkou do jaké míry vzniká ischemie.

Zajímalo by mne co si o možnosti příspěvku přímého působení endothelinu myslí autorka. Nemohlo by jít o kombinaci působení ischemie a přímého vlivu endothelinu?

Velmi zajímavá je diskutovaná možnost poruchy učení díky kombinaci léze v hipokampu a působení opakovaných epileptických záchvatů. Co se týče nepřítomnosti motorických poruch může být vysvětlením podrobnější morfologická analýza striata a neokortexu kam léze nebyla cílena. Na druhé straně je známo, že u neokortikálních ictů vznikají i vzdálené změny diaschiza, které by mohly mít vliv na motoriku.

V práci je pro detekci buněčné smrti použito Fluoro – Jade B – nezvažuje autorka nějakou specifickou metodu odlišující apoptózu od nekrózy?

Co si autorka myslí o možném vlivu poruchy hematoencefalické bariery na vznik pozdních důsledků léze vyvolané v časné ontogenezi?

Práce dr. Adely Máteffyové výrazným způsobem přispívá k poznání důsledků fokální ischemické léze vyvolané v hipokampu mláďat experimentálních potkanů aplikací endothelinu-1. Jedná se o prioritní nálezy cenné pro rozvoj oboru. Autorčiny nálezy ukazují její vysokou erudici, schopnost samostatně pracovat. Autorka je schopna své názory kriticky hodnotit a zařadit je i do světového kontextu. **Proto doporučuji komisi, aby jí po úspěšné obhajobě udělila hodnost a titul PhD za jménem. Autorka splňuje podmínky stanovené v kapitole VI, § 2 odst. 1 Řádu postgraduálního doktorského studia biomedicíny a § 47 odst. 4 Zákona o vysokých školách č. 111/1998 Sb.**

9.4.2007

doc. MUDr. Jan Mareš, CSc.

ÚNPKF 3.LF UK