Posudek oponenta disertační práce

Mgr. Jan Svoboda: Permeability of blood brain barrier during cerebral ischemia

Prostupnost hematoencefalické bariéry při mozkové ischémii

Posuzovaná disertační práce se zaměřuje na detekci a kvantifikaci narušení (propustnosti) hematoencefalické briéry (BBB) po mozkové ischemii. Řada publikovaných studií se zabývá pouze akutní reakcí na ischemii, přičemž nejsou detekovány chronické účinky a procesy zotavení, které jsou klíčové pro správnou volbu rehabilitačních postupů po ischemické cévní mozkové příhodě (iCMP). Tato si disertační práce si všímá a hledá řešení právě ve sledování časového vývoje důležitých markant po ischémii.

Předložená disertační práce řeší aktuální téma.

Autor ve své práci využívá kombinaci klinické studie prováděné na pacientech iktového centra FN Motol pomocí vyšetření neinvazivní metodou Magnetické rezonance (MRI). Dále je provedena rozsáhlá experimentální studie na zvířecích modelech iCMP. V obou těchto metodách jsou využity recentní postupy a protokoly na základě podrobné odborné rešerše literatury. Byla provedena řada dílčích (před)experimentů, které ověřovaly vhodnost či nevhodnost některých postupů, které byly popsány v rámci výzkumných prací renomovaných pracovišť.

Například pro experimentální model iCMP s kontrolovaným obnovením krevního toku se jako vhodná jevila metoda SIMPLE - model mozkové ischemie s magnetickými nanočásticemi. Dle autorů lze řízením vnějšího magnetického pole přímo určit místo, velikost a trvání ischemických událostí, stejně jako obnovu perfuze ischemické oblasti odstraněním vnějšího magnetického pole. Výsledky testů byly uveřejněny v diplomové práci Zuzany Velentové pod vedením disertanta mgr. Svobody napsané v roce 2020. Analýza výsledků ale ukázala, že tento model reálně vykazuje řadu nedostatků, mezi které patří především nespolehlivost reperfuze. Závěrem této části studie byl, že model není vhodný pro navazující studium popisu otevření BBB.

Mohu tedy konstatovat, že autor využívá vhodné stávající dostupné metody a zároveň hledá jejich vhodné modifikace za účelem řešení vytyčených cílů.

V práci jsou dobře popsány a vysvětleny odborné pojmy, děje a souvislosti. Jsou vypracovány vhodné rešerše odborné literatury, informace kriticky hodnotí a správně interpretuje.

Autor popisuje provedenou klinickou studii, která proběhla v iktovém centru Fakultní nemocnice v Motole ve spolupráci s doc. Tomkem a především Ing. Davidem Kalou PhD,. Subakutní MR vyšetření byla provedena mezi 7 a 12 dny po nástupu příznaků. Byly použity sekvence MRI a vyhodnocení signálu podle postupů vybraných na základě rešerše odborných studií s cílem postihnout narušení BBB v následném čase (dny) po ischemii. Byla provedena podrobná časově-prostorová analýza zrání cévní dysfunkce v rámci ischemické léze během subakutní fáze. To je právě období, ve kterém velká experimentální studie (rešerše) na zvířecích modelech zkoumaly časovou osu poškození BBB a odhalily vrchol v subakutní fázi (7–21 dní), po kterém následuje postupné snižování. Proto byla během druhého týdne hospitalizace (7-12 dní) provedena série MRI skenů, jak s gadoliniovým kontrastem, tak bez něj, a analyzovány prostorové vztahy mezi oblastmi poškození BBB a podoblastmi ischemických lézí, definovanými změnami FLAIR nebo DWI. Tímto postupem bylo možné rozlišit probíhající

patofyziologické procesy (vazogenní versus cytotoxický edém). Data 86 pacientů byla statisticky vyhodnocena. Na základě přítomnosti narušení BBB byli pacienti rozděleni do dvou skupin: ti s porušenou BBB a ti s intaktní BBB. Klinické charakteristiky obou skupin byly porovnány. Autor výsledky uvádí přehledně a srozumitelně.

V páté a šesté kapitole autor shrnuje přístupy a poznatky experimentálních modelů. Přestože jsou možnosti jejich provedení omezené, jsou významným a potřebným prostředkem pro možnost *in vivo* ověřování patofyziologických procesů a možností terapie. Pro účely této studie bylo důležité vybrat vhodné techniky okluze mozkových cév. Výběr se zaměřil na techniky s možností obnovení průtoku krve, kdy lze sledovat účinky a časové charakteristiky terapie. Byla řešena i lokalizace způsobené okluze – střední mozková tepna (MCA) a její větve jsou cerebrální cévy, které jsou nejčastěji postiženy při lidské ischemické cévní mozkové příhodě. Studie v rešerši potvrzují, že s touto lokací okluze se objevují často chronické komplikace, jako je vaskulární epilepsie.

Model intraluminální vláknové MCAO (Middle cerebral artery occlusion) přináší významné důsledky pro preklinické testování nových terapeutických strategií. Je vhodný pro tuto studii, protože umožňuje analýzu jak akutních, tak chronických fází ischemického poškození, stejně jako účinků reperfuze.

Autor se z důvodu minimalizace variability zabýval výběrem vhodného kmene potkana pro experimentální výzkum mozkové příhody. Tato práce má i velký význam pro redukci počtu zvířat užívaných v experimentech, kdy statisticky významného výsledku se díky menšímu rozptylu dosáhne při menším počtu subjektů.

Autor dále podrobně popisuje experimentální protokol, který byl řádně schválen Etickou komisí. Byl realizován experiment u 34 potkanů. Byla sledována a kvanitifikována propustnost BBB spektrometrií s využitím nitrožilně podaného exogenního barviva, konkrétně Evansovy modři. Sledování proběhlo ve časech 6, 24, 48 a 72 hodin po reperfuzi. Detekce barviva v tkání pomocí spektrofotometrie je v literatuře běžně užívaná metoda kvanitifikace poruchy BBB. Autor detekoval signifikantní narušení BBB v několika časových bodech. Velmi pozitivně hodnotím i autorovu kritickou diskuzi k samotné metodě, kdy je zřejmé, že v běžně používaném protokolu lze použít spíše pro binární hodnocení – je respetive není propustnost BBB – nikoliv však pro hodnocení kvantitavní. PET snímkování účinně identifikovalo hypometabolické oblasti korespondující s ischemickou oblastí. Pro jednotlivé neuroanatomické struktury segmentované pomocí MRI atlasu v obou hemisférách byly vypočteny poměry mezi pravou a levou stranou. Veškeré výsledky byly statisticky vyhodnoceny a přehledně a uceleně prezentovány.

V závěru práce autor předkládá výsledky pilotní studie s využitím 7T MRI při modelu intraluminální okluze MCA. Využití MRI v oblasti výzkumu na zvířatech má několik výhod. Jedním z nejvýznamnějších přínosů je neinvazivní povaha, která umožňuje opakované měření u stejného zvířete v průběhu času. Což umožňuje longitudinální sledování progrese onemocnění a terapeutických účinků. Předložené výsledky jasně potvrzují proveditelnost této metody a využitím pokročilé analýzy difuzních snímků s použitím kompartmentového modelu (DBSI) přináší i podrobnější vhled do změn mikrostruktury tkáně.

I v experimentální části disertační práce j**sou relevantně uvedeny metodiky, výsledky a jejich odborná diskuse realizovaných výzkumných a experimentálních studií je na velmi dobré odborné úrovni potvrzující přehled autora v dané problematice.**

Disertační práce mgr.Svobody má jasný dopad do běžné klinické praxe i experimentálního výzkumu. Za vysoce hodnotné považuji nálezy z klinické studie ukazující na stále probíhající dynamické změny mozkové tkáně v době, kdy je pacient často propouštěn z nemocniční péče. Experimentální část je uceleným souborem metodických postupů, které jistě poslouží pro efektivní design budoucích studií včetně testování terapeutických postupů. Snížení variability rovněž umožňuje snižovat počty laboratorních zvířat potřebných k dosažení statisticky signifikantního výsledku.

Publikační aktivita disertanta je dostatečná a výsledky publikovaných prací vhodně uplatňuje v disertační práci. Autor publikoval 6 odborných prací v časopise s IF nebo recenzovaném časopise z toho je jedna prvoautorská, 3 práce se přímo týkají disertační práce včetně prvoautorské. Další 2 publikace jsou v přípravě anebo již odeslané k recenznímu řízení do prestižních časopisů s IF.

Otázky k obhajobě:

1. Metoda okluze pomocí magnetických nanočástic a vnějšího magnetického pole v disertační práci nebyla vyhodnocena jako vhodná. Původní autoři však ukázali řadu výhod. Můžete prosím kriticky zhodnotit důvody, proč podle Vašeho názoru nedochází k reperfuzi po odstranění vnějšího magnetického pole? Využívá v současnosti některá z laboratoří tento model?
2. V popisu vláknové intraluminální okluze MCA je uvedeno, že vlákno se zavádí k do vnitřní krkavice k odstupu MCA. Jak je toto místo odstupu zjištěno a kontrolován adekvátní pokles mozkové perfuze? Jak často se u tohoto modelu vyskytuje komplikace v podobě porušení cévy a mozkového krvácení? Jak lze tento stav rozpoznat?

Závěr

V rámci textu práce autor prokazuje dobré odborné znalosti. Velmi pěkně zpracovává rešerše dílčích problematik – oceňuji především vhodně zvolené zdroje a ucelenost výsledného sdělení. Následně z nich vyvozuje důsledky pro řešení vlastních postupů. Tento krok není někdy jasně popsán, ale čitatel je následně pochopí. Zvolené experimentální metody jsou na vysoké odborné úrovni. Zpracování a interpretace dat je kvalitní a vhodné. Po formální stránce je práce vyhovující.

Práce splňuje nároky disertační práce dle Studijního a zkušebního řádu UK.

Proto navrhuji, aby v případě úspěšné obhajoby práce, byl Mgr. Janu Svobodovi udělen akademicko-vědecký titul doktor (PhD.).

V Praze, 20.2.2025

Doc. Ing. Monika Šorfová, Ph.D.

Katedra biomedicínského základu v kinantropologii

Univerzita Karlova

Fakulta tělesné výchovy a sportu