OPONENTSKÝ POSUDEK

na dizertační práci **ing. Lukáše Rambouska** (2. lékařská fakulta, Univerzita Karlova v Praze), studijní program Neurovědy, „**Biologický význam neuroaktivních steroidů v animálních modelech onemocnění mozku**“

Dizertační práce autora se opírá zejména o výsledky dvou publikací otištěných v zahraničních časopisech s impakt faktorem. Ing. Rambousek je prvním autorem u jedné publikace, u druhé je autorem druhým. Dále je ing. Rambousek spoluautorem 2 patentových přihlášek, které mají rovněž vztah k předkládané práci. Ing. Rambousek je rovněž autorem či spoluautorem 7 publikací s impakt faktorem, které nejsou zahrnuty v dizertační práci a tří kapitol v zahraničních monografiích. Sumární IF publikovaných prací autora je 31, což je vysoce nadprůměrné číslo.

Předkládaná práce má adekvátní formu i obsah (65 stran vlastního textu, a více než 200 citací k danému tématu ze světové odborné literatury). Práce je psána v angličtině a je zpracovaná a řazena běžně používaným způsobem psaní vědeckého díla, tj. v kapitolách: Úvod, Cíl práce, Metodika, Výsledky, Diskuse, Závěr a Literatura. Po jazykové stránce je slabší stránkou autora používání členů a interpunkce. Jsou to však drobné chyby, které nijak zásadně nebrání porozumění. Práci by nicméně určitě neuškodila pozornější korektura (např. dva překlepy již v abstraktu, jeden a tentýž překlep „sensorimotor grating“ se vyskytuje v abstraktu i v závěru). Jednotlivé formální připomínky shrnuji v závěru tohoto textu.

Autor si zvolil významné téma z oblasti psychofarmakologie s cílem odhalit behaviorální a regenerativní vlastnosti neuroaktivního steroidu pregnanolon glutamátu. Dizertační práce se soustřeďuje na popis účinku této látky za základní screeningové testy, které se používají ke studiu látek ovlivňujících psychická onemocnění, jako jsou např. deprese, úzkost či schizofrenie.

V první části „Úvod“ autor na cca. 22 stranách podává přehled o neurosteroidech, jejich struktuře, metabolismu, mechanismu účinku a předpokládanému fyziologickému, patofyziologickému a potencionálně terapeutickému účinku či využití. Toto rozdělení je logické a autor se soustředí na rozsáhlý popis současného stavu poznání o těchto látkách. Autor se nesoustředí pouze na „akademické“ publikace a součástí tohoto přehledu je i stav vývoje těchto látek ve farmaceutickém průmyslu. Dále je zde podán přehled o farmakokinetických a farmakodynamických vlastnostech této látky a základní přehled zvolených behaviorálních testů.

Cíle práce jsou stanoveny poměrně jasně a jsou v souladu s publikovanými pracemi, i když je nutno přiznat, že v publikovaných pracích jsou jednotlivé cíle stanoveny poněkud přesněji a v lepším souladu s provedením vlastních experimentů.

Část „Metody“ obsahuje podrobný popis zvolených metodik odpovídajících vědeckému způsobu práce.

Část „Výsledky“ shrnuje publikované výsledky v ucelené formě a v logicky návazných krocích. Nicméně bych zde ocenil jistý závěr či krátké shrnutí výsledků pro jednotlivé části experimentální práce. Přeci jen výsledky získané během několika let intenzivní činnosti by zasluhovaly lepší shrnutí v uvedení do celkového kontextu. Toto bych zdůraznil především v kontextu závěrů této práce, které jsou poměrně neurčité a nenabízí např. alternativní vysvětlení.

Diskuse na necelých 6 stránkách popisuje získané výsledky včetně jejich kritického zhodnocení v porovnání s pracemi jiných autorů. Vzhledem k tomu, že tyto publikace byly otištěny vesměs v časopisech se solidním impakt faktorem, je nepochybné, že tyto výsledky jsou do jisté míry unikátní. Relativně velké množství kvalitních publikací dává samo o sobě záruku, že prezentované výsledky jsou kvalitní a zapadají do kontextu poznání ve zkoumané oblasti a že si autor osvojil metody vědecké práce.

V poslední části, „Závěr“, autor prezentuje nejdůležitější závěry, které byly v jednotlivých pracích publikovány. V této části bych očekával především jasné odpovědi na hypotézy, které si autor na začátku stanovil. Závěry by měly být stručné a jasné tak, aby bylo zřejmé, co je největším přínosem této práce. Takto formulované závěry mi do jisté míry chybí, včetně možného praktického přesahu publikovaným výsledků.

Formální připomínky:

Str. 5 odst. 2 ř. 2 překlep – sensorimotor grating (má být „gating“) (i v dalších místech práce)

Str. 5 odst. 2 ř. 5 překlep – deficit of rats induces by NMDA lesion (má být „induced“)

str. 17, odst.1, ř.4-5 a str. 18 konec 2. odstavce

- sjednotit názvosloví receptorových podjednotek dle nové nomenklatury (NR3A = GluN3A?)

Str. 22, odst. 1, ř.9 překlep - This increase in hypothesized to be connected (má být „is“)

Str. 23, kapitola 1.2.1 odst. 1, ř. 4 nadbytečné adverbium - (neurosteroids) readily cross the blood-brain barrier easily

Str. 23, kapitola 1.2.1 odst. 1, ř. 7 nesprávná větná konstrukce - they are predicted to have reduced abuse potential (patrně míněno „they are reported“).

Str. 24, odst. 5, ř. 4 nemohu najít informaci o kancerogenních účincích neurosteroidů v citovaném odkazu

Str. 25, odst.2, ř. 3 překlep (?) – míněna molekula SAGE-547 (= allopregnanolone) ?

Str. 27 ř. 3 předložená data nejsou dostačující pro tvrzení, že pregnanolon glutamát se neakumuluje ve tkáních, zvláště vezmeme-li v úvahu, že se jedná o lipofilní molekulu

Str. 31 kapitola 1.3.2 nesprávná větná konstrukce „Its deficit is phenomena“, lépe např. Its deficit is typical of …

Str. 32 kapitola 1.3.3 „Some argue that hippocampus supports declarative memory …“ zde autor na čtyřech řádcích zkopíroval slovo od slova celou větu z abstraktu Eichenbauma a Cohena, 2014. Ačkoli uvádí zdroj, měl by si na toto v budoucnu dávat pozor, protože při doslovné citaci většího rozsahu bez použití uvozovek se jedná o plagiarismus. Pokud je takových případů v textu více, bylo by vhodné je opravit a přepsat vlastními slovy.

Str. 35 závěr kapitoly „Hippocampus is a paired structure, one of the main components ….learning and memory. “ působí na tomto místě velmi zvláštně a absolutně mimo kontext. Str.

Str. 38 Sekce Passive avoidance task ř.1 fear-aggravated behavioral task – tento výraz tu nedává žádný smysl.

Str. 40 „Only data from session four were analyzed.“ Proč? Vysvětlení odvolávající se na předchozí studie není dostačující. Není možno najít v metodách délku jednotlivých sessions v Carousal maze. Pokud tato informace skutečně chybí, měla by se doplnit. Přepokládám, že to bylo 20 min?

Str. 51, Obr. 15 Bylo by vhodné uvést data, z nichž by bylo zřejmé, kolik přesně měly jednotlivé skupiny v průměru vstupů do „ zakázaného“ sektoru. Z grafu se zdá, že skupina pregnanolon glutamát 10 mg/kg měla v průměru mezi 15-20 vstupy. Při rotaci arény rychlostí 1 otáčky za minutu by teoreticky měl mrtvý potkan, který se vůbec nehýbe, během 20-minutového sezení pouze 20 vstupů. Takový výsledek však nelze interpretovat jako dvakrát „lepší“ z hlediska kognice oproti např. ketaminové skupině 10 mg/kg (cca 40 vstupů), a to bez ohledu na výsledky statistiky. Spíš to naznačuje možný problém s výkonem u kontrolní skupiny v tomto pokuse.

Str. 52 Obr. 16 dtto. Téměř 20 vstupů/20 min v průměru u skupin 0.0001 mg/kg pregnanolon glutamát a 10 mg/kg pregnanolon glutamát ve čtvrtém sezení je příliš mnoho. Nesouhlasím s interpretací, že zvířata neměla žádný kognitivní deficit; naopak výkon kontrolních zvířat byl patrně suboptimální a data je tudíž obtížné jednoznačně interpretovat. Možná by pomohlo ukázat i výsledky Max Time Avoided.

Str. 56 ř.4 „The damage (…) remained focally“ Lépe: remained focal.

Str. 56 ř.7 „as welll as did not propagate“ Lépe: nor was it found to propagate.

Str. 56 konec odstavce – chybějící zájmeno they „The neurons (…) were swollen; however, they sustained …“

Str. 72 sekce Exp. 2, ř.1 překlep „We demonstrated precognitive effect …“ namísto „procognitive“.

Str. 72 začátek posledního odstavce-chybná větná struktura. „In previous studies reported (…)“ Má být patrně „ Previous studies reported (…).“

Kritické připomínky:

1. V autoreferátu chybí přehled dalších aktivit autora, tj. aktivní účasti na konferencích, zahraničních stážích a dalších významných skutečností souvisejících s postgraduálním studiem, které autor během svého studia bezpochyby absolvoval či se jich zúčastnil.
2. Domnívám se, že vzhledem k tomu, že zvířatům byly aplikovány látky během fáze učení (podkapitola 4.1.4. a 4.2.1.), by bylo vhodné ukázat i výsledky ze dnů 1-3 (křivky učení). Důležitým parametrem v této úloze je Max Time Avoided, ten byl ovšem analyzován jen v experimentu 3 (podkapitola 4.3.1). Není zdůvodněno proč tomu tak je. Chybí podrobnější popis chování potkanů, jejich vyhýbacích strategií, a jak byly tyto ovlivněny aplikací jednotlivých látek.
3. Kapitola „Závěr“ by měla jasně a stručně shrnout pozorované výsledky a vyzdvihnout jejich význam.

Otázky:

1. Využití negativního modulátoru NMDA receptoru ke zlepšení kognice v modelu schizofrenie je na první pohled kontraintuitivní, vzhledem k tomu, že NMDA antagonisté i některé negativní NMDA modulátory mohou mít psychomimetický efekt. Můžete se blíže vyjádřit k přepokládaným mechanismům prokognitivního účinku pregnanolon glutamátu v MK-801 modelu schizofrenie?
2. Máte nějakou hypotézu, která by vysvětlovala, proč pregnanolon glutamát při aplikaci po NMDA lézi negativně ovlivnil lokomoci pokusných zvířat?
3. Farmakokinetický profil pregananolonu glutamátu (str. 27) naznačuje vyšší biologickou dostupnost po perorální podání ve srovnání s podáním parenterálním. Můžete vysvětlit pozorované výsledky?
4. Je možné, že pregnanolon glutamát má ve vyšší dávce analgetické účinky? Jak reagovala zvířata po aplikaci vyšších dávek pregnanolon glutamát na vstup do šokového sektoru? Jak ovlivnila aplikace pregnanolon glutamát vyhýbací strategie u zvířat v MK-801 modelu schizofrenie?

Závěr:

Ing. Lukáš Rambousek ve své dizertační práci prokázal vynikající odborné znalosti a schopnost kvalitní práce ve vědecko-výzkumné oblasti. Dizertační práce řeší aktuální téma a má vysokou věcnou i formální úroveň. Použité metody a postupy jsou standardní v oblasti behaviorální farmakologie a svědčí o schopnosti autora samostatně vědecky pracovat. Autor publikoval během svého studia 9 prací v zahraničních časopisech s IF (3 x jako první autor) a není pochyb o tom, že si autor velmi dobře osvojila způsoby vědecké práce. Originální publikace v renomovaných časopisech jsou velmi kvalitní a rovněž splňují požadavky pro úspěšné ukončení doktorského studijního programu. **Doporučuji proto, aby dizertační práce Ing. Lukáše Rambouska byla po její veřejné obhajobě a zodpovězení otázek oponentů přijata jako doklad úspěšného doktorského studia v oboru Neurovědy a aby byl autorovi podle příslušného paragrafu platného Vysokoškolského zákona udělen titul Ph.D.**

doc. MUDr. Martin Votava, Ph.D. Praze dne 5. června 2015