

Oponentský posudek na magisterskou práci:

**Lenka Harantová (2012): Volume-regulated anion channels in astrocytes – in vitro and in situ analysis**

---

Magisterská práce Lenky Harantové se zabývá studiem aniontových kanálů, aktivovaných změnou buněčného objemu („volume-regulated anion channels“, VRAC) v primární astrocytární kultuře i na řezech v oblasti CA1 hipokampu a vznikla na podkladě výsledků, získaných autorkou během její stáže v Oddělení buněčné neurofyzologie Ústavu experimentální medicíny AVČR, pod vedením Ing. Miroslavy Anděrové, PhD.

### **Celkový popis práce**

VRAC jsou aniontové kanály, které hrají významnou úlohu při změnách a regulaci buněčného objemu velkého spektra typů buněk, včetně neuronů i astrocytů. Ačkoliv jsou relativně dobře popsány jejich elektrofyziologické vlastnosti, nebyly dosud identifikovány na molekulární úrovni a není ani jasné, jestli patří k jednomu typu iontových kanálů, nebo změny, přisuzované jejich aktivaci, jsou výsledkem spolupráce skupiny typově různých kanálů. Předkládaná práce, snažící se o charakteristiku VRAC kanálů během hypotonického stresu na úrovni astrocytární kultury a in situ je proto velmi aktuální a důležitá. Výsledky práce ukazují, že proudy, které jsou charakteristické pro VRAC aktivaci, se během expozice hypotonickému roztoku zvyšují a významně roste rovněž celková vodivost buňky. Tento efekt je výraznější v buňkách v kultuře než in situ, kde VRAC proudy vykazovala méně než polovina studovaných astrocytů. Vliv hypotonického stresu potlačují blokátory VRAC kanálů tamoxifen a DCPIB. Zajímavým zjištěním je rovněž, že aktivita VRAC je potlačena zvýšenou koncentrací intracelulárního sodíku, což může mít důsledky při změnách objemu buněk během patologických stavů, např. ischemie.

### **Formální kvalita**

Celá práce, obsahující včetně citací 58 stran, je napsaná na dobré úrovni, bez větších formálních chyb, ale chyby z nepozornosti a překlepy (viz připomínky).

### **Jazyk**

Dobrá formulace, bez větších gramatických chyb.

### **Hodnocení částí předkládaného spisu**

#### **1 Literární přehled**

Literární úvod obsahuje 17 stránek charakterizující studovaný objekt práce: astrocyty a především VRAC kanály. Autorka tady detailně popsala dosud známá fakta o jejich základních vlastnostech, aktivaci a modulaci a rovněž jejich úlohy během fyziologických a patologických stavů při regulaci buněčného objemu, v procesu apoptózy, buněčné proliferace a migrace. Do tohoto konceptu, alespoň z mého hlediska moc nezapadá krátká kapitola o metodě terčíkového zámku, kterou bych radila přesunout spíše do metodiky. Popis je doplněn vhodně zvolenými, přehlednými schématy s přesnou citací. Literární úvod je založen především na nejnovějších poznatcích v oboru a dokumentuje schopnost autorky pracovat s informacemi z odborné literatury.

#### **2 Cíle**

v podobě tří bodů jsou stanoveny konkrétně a přehledně.

### 3 Materiál a metody

Podrobný a názorný popis použitých metod od přípravy akutních řezů a primárních astrocytárních kultur, přes elektrofyziologické měření a analýzu, pomocí metody terčíkového zámku až po imunohistochemii a konfokální mikroskopii naznačuje jejich rutinní zvládnutí.

### 4 Výsledky

Dosažené výsledky jsou srozumitelně popsány a dokumentovány relevantními obrázky a názornými grafy.

### 5 Diskuse

Ve věcné diskusi autorka rozebírá jednotlivé dílčí nálezy a hledá možná vysvětlení pro nalezené rozdíly mezi výsledky in vitro a in situ.

**Úroveň této diplomové práce je postačující k obhajobě a dokladem připravenosti autorky k další vědecké práci.**

---

### Dílčí připomínky a otázky do diskuse

1. Str.14, popis  $\text{Na}^+$  homeostázy: “During neuronal firing,  $\text{Na}^+$  released by neurons enters perisynaptic astrocytes through the action of  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPases and glutamate transporters and receptors (Langer et al. 2009).” Tato věta je nesmysl a podle úrovně ostatních částí práce předpokládám, že vznikla z nepozornosti. Ráda bych, aby autorka vysvětlila, co vlastně chtěla říct.
2. Tabulky 1 a 2 popisující složení použitých roztoků mají stejné složení pro isotonický a hypotonický roztok. V textu, popisujícího měření v kultuře, se dá dohledat, že isotonický roztok byl připraven s použitím manitolu, který byl u hypotonického vynechán. Doporučovala bych proto doplnit manitol rovněž v tabulce, aby informace nebyly zavádějící. Není ale jasné, jestli byl podobným způsobem připraven pro experimenty in situ, nebo jestli je chyba v tabulce.
3. Str. 41, obr. 13 – popis A, B, C neodpovídá legendě obrázku.
4. Ačkoliv je často používaná, doporučovala bych při prvním použití vysvětlit i zkratku  $[\text{K}^+]_o$ .
5. Drobné chyby a překlepy předám autorce samostatně.
6. Z formálního hlediska bych autorce vytkla poměrně malé složené obrázky č. 10, 11, 14, 15.

### Otázky:

1. Které membránové proteiny by mohly být, dle vašeho názoru, vhodnými kandidáty pro VRACs?
2. Vzhledem k tomu, že jste ukázala, že pouze 50% astrocytů vykazovalo významné zvýšení proudu v hypotonickém roztoku, lze z toho usuzovat, že se liší schopnost jednotlivých astrocytů CA1 oblasti hipokampu regulovat buněčný objem? Jestliže ano, tak proč?
3. Jaký podíl na RVD mohou mít mechano-senzitivní iontové kanály? Existují studie, které ukazují podíl těchto iontových kanálů na RVD u jiných buněčných typů?
4. Když uvádíte v diskuzi, že tamoxifen je spíše nespecifický inhibitor VRAC, které další děje v buňce tento inhibitor ovlivňuje? Jak byste vysvětlila Váš zajímavý nálezy, že

aplikace hypotonického roztoku s tamoxifenem nejen zablokovala aktivitu VRAC, ale dokonce snížila proudovou amplitudu pod hodnotu, naměřenou v isotonickém roztoku?

---

V Praze dne 5.9. 2012

Doc. MUDr. Lýdia Vargová, PhD.  
oponent