

Oponentský posudek na magisterskou práci:

Michaela Mikešová (2012): Objemové změny astrocytů u α -syntrofin deficientních myši

Magisterská práce Michaely Mikešové je zaměřena na studium úlohy aquaporinových kanálů v mechanismech změn buněčného objemu v experimentálních modelech in situ a vznikla na podkladě výsledků, získaných autorkou během její stáže v Oddělení buněčné neurofyziologie Ústavu experimentální medicíny AVČR, pod vedením Ing. Miroslavy Anděrové, PhD.

Celkový popis práce

Práce si klade za cíl objasnit úlohu α -syntrofinu, kotvícího proteinu aquaporinových kanálů AQP4, v mechanismech změn objemu kortikálních astrocytů při experimentálně navozených změnách osmolality, zvýšené koncentraci extracelulárního draslíku či oxygen-glukózové deprivaci, modelujících vznik mozkového edému např. během ischemie nebo při traumatu. Pro tento účel byl v laboratoři vytvořen dvojitě transgenní kmen myši, který kromě delece α -syntrofinu vykazuje rovněž fluorescentně zvýrazněné astrocyty pomocí proteinu EGFP, exprimovaným pod GFAP promotorem a který takto umožňuje detailní studium morfologických změn astrocytů metodou 3-D konfokální morfometrie. Výsledky práce ukazují, že delece genu pro α -syntrofin nezpůsobila signifikantně významné rozdíly oproti kontrolám ve vývoji objemových změn během mírného hypotonického stresu (-50 mOsm), ale zpomalila objemové změny při hypertonickém stresu (aplikace mannitolu) a oxygen-glukózové deprivaci (OGD). Změny objemu a plochy astrocytů, vyvolané aplikací 10 mM K^+ naznačují, že transport K^+ je u transgenních myši pozměněn a rozdíly v regulaci buněčného objemu oproti kontrolám během vymývání závisí na délce trvání zvýšené koncentrace K^+ .

Formální kvalita

Celá práce, obsahující včetně citací 74 stran, je pečlivě napsaná, bez větších formálních chyb a jen s několika drobnými chybami z nepozornosti (viz připomínky).

Jazyk

Dobrá formulace, bez větších gramatických chyb (minimum překlepů).

Hodnocení částí předkládaného spisu

1 Literární přehled

Na začátku 21-ti stránkového literárního úvodu jsou shrnuty základní údaje o astrocytech a jejich homeostatických funkcích. Vzhledem k zaměření práce je rozsáhlejší část přehledu věnována popisu projevů buněčné ischemie, mechanismů regulace buněčného objemu a transportu vody se zaměřením na charakteristiku vodních kanálů, především AQP4. Popis je doplněn vhodně zvolenými, přehlednými schémata 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

Tato část dokumentuje značné množství metod, které autorka zvládla: od metod, potřebných pro generaci a ověření vlastností transgenního kmene GFAP/EGFP/ α -Syn^{-/-} myši

včetně PCR genotypizace, western blottingu a imunohistochemie, přes přípravu tkáňových řezů mozku až po vlastní měření objemu buněk metodou 3D konfokální morfometrie. Popis použitých metod je názorný, rozsahově i formulačně odpovídající a doplněný ilustračními schémata.

4 Výsledky

Dosažené výsledky jsou srozumitelně popsány a dokumentovány histologickými obrázky a především názornými grafy.

5 Diskuse

Podrobná diskuse je, alespoň z mého hlediska, silnou stránkou této práce. Autorka zde rozebírá jednotlivé dílčí nálezy, analyzuje úlohu α -syntrofinu v mechanismech změn buněčného objemu a předkládá možná vysvětlení i pro některé kontroverzní nebo překvapivé výsledky.

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

Dílčí připomínky a otázky do diskuse

1. Při převádění obrázků z publikací bych doporučovala zvolit vyšší rozlišení, aby nebylo tak patrné rastrování.
2. Str.20, definice a příčiny mozkové ischemie: vzhledem k uvedeným příčinám (zástava srdce, dušení nebo tonutí) by bylo přesnější mluvit o globální ischemii/anoxii než pouze o globální ischemii.
3. Str. 52: "Roztok se zvýšenou koncentrací K^+ (10 mM) simuluje stav při zvýšené aktivitě neuronů, ke které dochází například během epileptických stavů"- přesněji při intenzivní stimulaci, epileptický stav zvyšuje extracelulární koncentraci K^+ nad 10 mM.
4. Věcné chyby z nepozornosti:
 - str. 18 syntézu glutaminu z glutamátu v astrocytech ukazuje obr. 7, ne 5.
 - Str. 58, obr. 32B: chybné údaje na časové ose.

Otázky:

1. Autorka v diskusi jako jednu z možných příčin zvyšování objemu astrocytů během působení hyperosmotického roztoku mannitolu uvádí akumulaci mannitolu v astrocytech. Tohle však bylo ukázáno na buňkách C6 gliomu a navíc v kultuře, takže tyto buňky mohou mít odlišné membránové vlastnosti včetně propustnosti pro mannitol. Prokázal se zvýšený uptake mannitolu i v jiných experimentálních studiích?
2. Při závažných patologiích, jako ischemie, stoupá extracelulární koncentrace draslíku vysoko nad 10 mM, která se spíše používá jako model fyziologických stavů. Nezkoušeli autoři jaké změny (případně rozdíly mezi transgenní a kontrolní tkání) vyvolá aplikace vyšších koncentrací K^+ ?