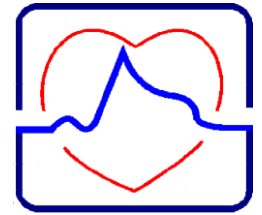




**CENTRUM EXPERIMENTÁLNEJ MEDICÍNY
SLOVENSKEJ AKADÉMIE VIED
o.z. Ústav pre výskum srdca**



Dúbravská cesta 9, 841 04 Bratislava

OPONENTSKÝ POSUDOK
na dizertačnú prácu

Autor práce: Mgr. Jana Kohútová

Názov: „Kardioprotektívni úloha adaptácií na hypoxii a chlad: Konexín 43 a hexokináza 2“

Študijný program: Fyziológia živočíchov

Oponent: RNDr. Miroslav Barančík, DrSc.

Predložená dizertačná práca Mgr. Jany Kohútovej je zameraná na sledovanie úlohy konexínu-43 (Cx43) v procesoch adaptácie srdca. Sledované boli predovšetkým zmeny vyvolané účinkami intermitentnej hypobarickej hypoxie (IHH) a chladu a jej cieľom bolo taktiež sledovať vzťah zmien v Cx43 k vnútrobunkovej signalizácii. Doktorandka vykonávala doktorandské štúdium pod vedením školiteľky RNDr. Jitky Žurmanové, Ph.D.

Zvolená téma dizertačnej práce je aktuálna a Mgr. Jana Kohútová si v jej rámci zvolila ciele, ktoré sú významné a dôležité z hľadiska rozšírenia poznatkov o úlohe Cx43 v kardioprotekcii a adaptácii na stresové (patologické) podnety. Práca rozširuje taktiež poznatky o úlohe vnútrobunkovej signalizácie (proteínkináz) v regulácii funkcie Cx43.

Práca je napísaná na 120 stranách, vrátane zoznamu použitej literatúry a prílohy s uvedením zloženia použitých roztokov a reagensí. V literárnom prehľade je pozornosť venovaná predovšetkým konexínom. Prehľadne sú uvedené ich základné charakteristiky, štruktúra a distribúcia jednotlivých izoforiem konexínov v rôznych častiach srdca. V ďalších častiach literárneho prehľadu sa autorka práce venovala tématike regulácie funkcie konexínov prostredníctvom fosforylácie a úlohe Cx43 v patologických stavoch a v kardioprotekcii. Dôležité sú tiež informácie o vzťahu medzi remodeláciou medzibunkových spojení (Cx43) a výskytom arytmií, ako aj o úlohe Cx43 v rozvoji arytmií vyvolaných ischemiou.

Ciele doktorandskej dizertačnej práce, ktoré som už spomínal, sú popísané dostatočne podrobne v ôsmich bodoch, pre budúcnosť by som však odporúčal ich zrozumiteľnejšiu a prehľadnejšiu formuláciu. Na splnenie zvolených cieľov boli zvolené primerané metodické prístupy, ktoré boli v dostatočnom rozsahu popísané v metodickej časti práce.

Z prezentovaných výsledkov vyplýva, že doktorandka stanovené ciele práce splnila a v rámci svojej práce získala viacero zaujímavých výsledkov. Dosiahnuté výsledky dokumentujú, že účinkom IHH dochádza nielen k zmenám v expresii Cx43, ale aj k pozitívnej redistribúcii Cx43 v ľavej komore a taktiež k rozdielnej špecifickej fosforylácii Cx43. Prezentované výsledky poukazujú na významnú úlohu viacerých signálnych dráh (PKA, PKG) v modulácii fosforylácie a tým aj funkcie Cx43 po účinkoch IHH. Výsledky poukazali

taktiež na potenciálne významnú úlohu Cx43 (zmeny v expresii a distribúcii) v procesoch zapojených do adaptácie srdca po vystavení akútnemu a chronickému chladu.

Výsledky práce sú prezentované v zrozumiteľnej forme a sú dobrou formou zhodnotené, aj vo vzťahu k doteraz známym skutočnostiam, v diskusii. Pokiaľ ide o úroveň formálnej stránky práce, grafická úprava je na dobrej úrovni, v práci je však niekoľko preklepov a chýb.

K práci a tématike s ňou súvisiacou mám niekoľko otázok a pripomienok:

1. Obrázok 13 ukazuje, že vystavenie potkanov účinkom akútnemu chladu (3D a 10D) nemalo za následok zmeny v proteínových hladinách celkového Cx43 (Obr. 13B), ani v hladinách fosforylovaných foriem Cx43 (P1+P2) (Obr. 13C). Reprezentatívny záznam z Western blot analýzy (Obr. 13A) však dokumentuje, že v skupine 10D sú hladiny detegovaných foriem Cx43 výrazne znížené. Po vystavení 10D chladu neboli skutočne zmeny v hladinách fosforylovaných foriem Cx43 ani v expresii celkového Cx43?
2. Podobný komentár ako pri obrázku 13 mám k výsledkom prezentovaným v obrázku 15. Aj tu ukazuje záznam z blotu (Obr. 15A), že účinkom chronického chladu (CH) dochádza k zvýšeniu jednotlivých foriem Cx43. Grafy prezentované v obrázku (B, C, D) však neuvádzajú žiadne významné zmeny medzi K a CH skupinou.
3. Zaujímavým bolo zistenie, že kým po účinkoch akútneho chladu (10 dní) dochádza k zníženiu distribúcie Cx43 v *end to end* spojeniach (Obr. 14), po 5 týždňoch bol pozorovaný opačný trend, teda zvýšenie distribúcie Cx43 v *end to end* spojeniach (Obr. 16). Vedeli by ste vysvetliť túto rozdielnu redistribúciu Cx43?
4. V porovnaní s normoxiou dochádzalo po účinkoch IHH k zväčšovaniu plochy p-Cx43(Ser368) v *end to end* spojeniach za bazálnych podmienok (Obr. 10B), aj po krátkej ischémii (Obr. 10C). Po reperfúzii však došlo k zníženiu plochy p-Cx43(Ser368) v *end to end* spojeniach v IHH srdciach na úroveň normoxickej skupiny (Obr. 10D). Vedeli by ste povedať, či a aký funkčný význam môže mať toto zníženie?
5. Pre realizáciu funkcie proteínkináz je dôležitá ich aktivácia, ktorá je často spojená so zmenou ich špecifickej fosforylácie alebo subcelulárnej lokalizácie. Máte informácie (dáta), či boli zmeny v hladinách Akt kinázy a MEK3 (Obr. 17) spojené aj so zmenami v ich aktivácii (špecifickej fosforyláci)?
6. Prečo ste si z MAPK vybrali MEK3? Tento enzým nie je priamo MAPK, je to MAPK kináza (MAPKK), ktorá sa podieľa na aktivácii p38-MAPK.

Napriek uvedeným pripomienkam chcem konštatovať, že prácu hodnotím pozitívne. Doktorandka splnila zadefinované ciele a predložená práca predstavuje prínos pre vedný rozvoj v oblasti výskumu zameraného na skúmanie úlohy Cx43 v kardioprotekcii a v adaptácii na patologické podnety.

Práca spĺňa podmienky kladené na dizertačnú prácu a udelenie titulu Ph.D., a preto ju odporúčam k obhajobe.