

## **Oponentský posudek doktorské disertační práce**

**Název práce:** Molekulární mechanismy synchronizace fetálních cirkadiánních hodin

Molecular mechanisms of entrainment of the fetal circadian clocks

**Autor práce:** Mgr. Vendula Lužná

**Pracoviště:** Univerzita Karlova Přírodovědecká fakulta

**Studijní program:** Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie

**Vedoucí práce:** doc. PharmDr. Alena Sumová, CSc., DSc.

**Oponent:** prof. PharmDr. František Štaud, Ph.D.

Předložená disertační práce Mgr. Venduly Lužné je zaměřena na osvětlení molekulárních principů nastavení cirkadiánních hodin v placentě a plodu v průběhu těhotenství. Ve své práci, která logicky navazuje na dosavadní výzkum školitelky doc. Sumové, se autorka konkrétně zaměřila na objasnění podstaty mateřských signálů a jejich vlivu na synchronizaci rytmů ve fetálních suprachiasmatických jádrech (SCN). Ke svému výzkumu využila moderní vědecké metodiky a jako modelové organismy zvolila myš a potkana. Protože fetální cirkadiánní hodiny jsou schopny specificky reagovat na různé změny v mateřské signalizaci, věnuje se autorka sledování vlivu několika chronobiologicky relevantních molekul na cirkadiánní systém ve fetoplacentární jednotce. Mezi hlavní výsledky předložené práce patří zjištění, že některé části placenty disponují funkčním hodinovým mechanismem a že jsou pod vlivem synchronizačních signálů zkoumaných molekul, konkrétně glukokortikoidů, dopaminu a melatoninu. Jedná se o velmi zajímavé téma, na kterém ve světě pracuje řada výzkumných týmů, ale dosud zůstává z velké míry neobjasněno.

Disertační práce Mgr. Venduly Lužné je psána v anglickém jazyce s klasickým členěním. V úvodní části autorka shrnuje současný stav poznání řešené problematiky a detailně čtenáře seznamuje s fyziologií cirkadiánních rytmů, architekturou a vývojem SCN a ve stručnosti také s placentou. Text je psán v anglickém jazyce, velmi čtivou a srozumitelnou formou s minimem překlepů nebo nepřesností. Prezentované informace jsou logicky provázané do smysluplného celku. Kladně hodnotím práci s literaturou, kde autorka cituje jak starší práce z 80. let minulého století až po ty nejaktuálnější.

Vysokou odbornost disertace a kvalitu získaných výsledků dokládají publikace *in extenso*, ve kterých autorka uveřejnila dosažené výsledky. Jedná se o jednu revíální práci a tři práce experimentální, všechny publikované v zahraničních odborných časopisech se souhrnným IF > 13. U všech originálních prací je Mgr. Lužná první autorkou a její podíl na publikacích je zásadní.

Diskuse je vedena velmi kvalitním způsobem, autorka zde dává svoje výsledky do širšího kontextu, porovnává je s pracemi jiných týmů, spekuluje nad významem dosažených výsledků a také kriticky přiznává slabiny a nedořešené otázky, čímž otvírá možnosti a směry dalšího výzkumu.

K předložené práci ani k jejím výsledkům nemám zásadní připomínky, pouze následující dotazy, poznámky a náměty do diskuse v rámci obhajoby:

1. Pokud jde o expresní studie, opíráte se převážně o kvantifikaci genové, nikoliv proteinové exprese. Jakým způsobem se v TTFL (transcriptional-translational feedback loops) projevují translační/post translační modifikace?
2. Jakou roli hraje v této problematice epigenetika?
3. Placenta je v mnoha ohledech pohlavně dimorfní orgán. Může tento fakt, tedy pohlaví plodu, hrát nějakou roli konkrétně ve vašich studiích a obecně v TTFL?
4. V publikacích č. 3 a 4 pozorujete cirkadiánní rytmy na maternální/deciduální straně placenty. Pokud by mělo dojít k jejich přenosu na plod, jaké jsou současné teorie, které by toto vysvětlovaly na molekulární/buněčné úrovni?
5. Na straně 29 disertace a straně 59 publikace č. 4 uvádíte, že melatonin a dopamin, volně přeloženo „jsou transportovány v téměř nemetabolizované formě přes placentu, aby dosáhly plodu“. U melatoninu je to, s ohledem na lipofilitu molekuly a absenci placentárního metabolismu, logické a vědecky dokumentované, u dopaminu jsem touto informací překvapen.
  - Můžete uvést z jakých původních zdrojů jste tuto informaci získala?
  - Jakým transportním mechanismem přechází dopamin z matky do plodu přes apikální a basální membránu syncytiotrophoblastu?
  - Jaké jsou dostupné informace k placentárnímu metabolismu dopaminu, např. MAO a/nebo COMT?
6. V experimentech s placentárními explanty používáte dopamin v koncentraci 100μM. Proč jste zvolila tuto koncentraci? Fyziologické koncentrace na periférii jsou výrazně nižší. Nezkoušeli jste také koncentrační závislosti?
7. V publikaci č. 3 na straně 13 uvádíte „We found that, **in the maternal part** of the rat placenta, the expression of Hsd11b2, the gene encoding the enzyme HSD2, which is **involved in placental barrier function**, also exhibits daily variation.... Therefore, the presumed rhythm in HSD2 activity might provide temporal control for the maternal GC levels passing through the placenta, and may serve as a potential mechanism preventing undesirable influx of excess GCs to the embryo at an improper time of day.“ Toto tvrzení se mi zdá příliš zjednodušené. Vzala jste v potaz, že:
  - HSD11b2 exprimovaná v maternální části placenty (decidua) nemá zásadní vliv na materno-fetální transport glukokortikoidů? K tomu slouží HSD11b2 exprimovaná ve fetální části placenty, syncytiotrophoblastu - jak u člověka, Bernal et al., 10.1016/0022-4731(80)90140-5), tak u potkana (Burton et al., 10.1095/biolreprod55.5.1023).
  - Placenta exprimuje obě formy HSD11b – 1 a 2 a tyto formy recipročně mění svoji expresi v průběhu těhotenství (Vagnerová et al., 10.1177/1933719108319161)?
  - Hladiny glukokortikoidů v plazmě během dne výrazně oscilují?

Závěr:

Svou disertační prací dokládá autorka rozsáhlé teoretické znalosti i praktické dovednosti, schopnost pracovat s odbornou literaturou, získávat nová experimentální data pomocí moderních metod molekulární biologie a tato následně prezentovat v kvalitních odborných časopisech. Práce tak splňuje požadavky kladené na doktorské práce v oboru a odpovídá požadavkům Zákona o vysokých školách (111/1998 Sb.). Jednoznačně doporučuji, aby tato práce byla přijata jako podklad pro další řízení k udělení titulu Ph.D.

V Hradci Králové

dne 2021-05-14

Prof. PharmDr. František Štaud, Ph.D.

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové