



UNIVERZITA KARLOVA
Přírodovědecká fakulta

Oponentský posudek na diplomovou práci

- Jméno studenta:** Bc. Tina Kititi
- Název práce:** Teplotní synchronizace fetálních cirkadiálních hodin
- Vedoucí práce:** prof. PharmDr. Alena Sumová, DSc.
- Oponent:** Mgr. Hana Sehadová, Ph.D.
- Afilie oponente:** Entomologický ústav, Biologické centrum Akademie věd České republiky a Přírodovědecká fakulta, Jihočeská univerzita, Branišovská 31, 370 05 České Budějovice, Czech Republic

Předkládaná diplomová práce studuje teplotní synchronizaci fetálních cirkadiálních hodin v suprachiasmatických jádrech (SCN) hypothalamu myšičího fětu v 17. dnu embryonálního vývoje (E17). Chod fetálních hodin byl studován *ex vivo* v organotypických explantátech SCN transgenních myšičích embryí, kde je hodinový gen *Period 2* (*Per2*) fúzován s genem pro luciferázu (*mPer2^{Luc}*). Teplotní synchronizace byla testována různými formami teplotní stimulace, a to aplikací jednorázového teplotního pulzu, jednorázového teplotního cyklu nebo opakovaných teplotních cyklů. Srovnáním základních parametrů bioluminiscenčních rytmů (jako je amplituda a perioda) před a po různé teplotní stimulaci byl stanoven vliv těchto teplotních stimulů na produkci *Per2* proteinu tj. na chod fetálních cirkadiálních hodin. Rytmus *Per2*-bioluminiscence byly sledovány i po aplikaci kvercetinu, který narušuje molekulární dráhu teplotního šoku. Práce dále hodnotí míru teplotní kompenzace ve fetálních a dospělých SCN pomocí výpočtu teplotního koeficientu Q10.

Práce obsahuje 66 stran a zahrnuje všechny náležitě části: abstrakt, úvod, literární přehled, hypotézu a cíle práce, metody a postup, výsledky, diskusi, závěr a seznam použité literatury. Práce je psaná v češtině.

Literární přehled o rozsahu 20 stran detailně popisuje anatomii, organizaci a molekulární mechanismy savčích cirkadiálních hodin. Srozumitelně osvětluje základní parametry cirkadiálního rytmu. Dále pojednává o ontogenezi cirkadiálního

oscilátoru během prenatálního vývoje, a to na tkáňové, molekulární a systémové úrovni. Seznamuje čtenáře se současnými poznatky o ovlivnění synchronizace fetálních hodin různými faktory působícími na matku jako jsou světelný režim a režim v příjmu potravy, které mohou měnit hormonální profil matky. Autorka dále pojednává o mechanismu udržení stabilních cirkadiálních rytmů tělesné teploty dospělých savců. Rytmus tělesné teploty slouží nejen jako výstupní signál z SCN, které samo je vůči změnám teploty odolné, ale působí jako vstupní signál pro synchronizaci periferních hodin. Závěrem autorka uvádí aktuální znalosti o teplotní synchronizaci fetálních hodin a o molekulární regulaci teplotní odpovědi v cirkadiálních hodinách. Zmíněná témata jsou autorkou zpracována čtivě a text je vhodně doplněn názornými schémata.

Cíle práce jsou jasně specifikovány a vedou k odpovědi na základní hypotézu, zda změny tělesné teploty matky mohou představovat další synchronizační signál pro vyvíjející se fetální hodiny v SCN.

Metodická část práce dokládá, že si autorka osvojila jak manipulaci s tkáňovými explantáty, tak práci s luminometrem LumiCycle 32 (Actimetrics, USA). Zvláště oceňuji, že autorka zvládla náročnou statistickou a srovnávací analýzu získaných dat v programech Lumi Cycle Analysis (Actimetrics, USA) a GraphPad Prism. Všechny použité metody a postupy jsou detailně popsány a obohaceny schémata připravenými v programu BioRender. Lze vytknout pouze to, že u popisu použitých roztoků se udává spíše výsledná molarita jednotlivých složek než jejich objem nebo hmotnost v daném objemu.

Výsledky srovnávající amplitudu a periodu rytmů Per2-bioluminiscence před a po aplikaci různých teplotních stimulů i po aplikaci kvercetinu jsou doplněny o dobře zpracované názorné záznamy bioluminiscence a grafy statistických analýz obdržných dat.

V diskusi autorka shrnuje získaná data a srovnává je s dosavadními výsledky, přičemž fundovaně odpovídá na otázky, které vyvstaly.

Závěrem nutno zmínit, že získané výsledky, přináší hodnotný vhled do studované problematiky ontogeneze cirkadiálních hodin. Byla podpořena hypotéza, že změny tělesné teploty matky mohou sloužit jako významný synchronizační signál pro vyvíjející se cirkadiální hodiny plodu ve fetálním SCN. Práce rovněž hodnotí limitaci použití *ex vivo* modelu organotypických explantátů, které jsou vytrženy z kontextu celého organismu. Studentka si osvojila práci na moderním analytickém přístroji, provedla řadu časově náročných experimentů a jejich statistické vyhodnocení. Rovněž k sepsání diplomové práce přistoupila s velkou pečlivostí. Z textu je patrné, že zpracování problematiky věnovala značné úsilí a nastudovala velké množství odborné cizojazyčné literatury (102 literárních zdrojů).

Předkládaná práce svým obsahem i formou nejen splňuje, ale i převyšuje požadavky kladené na diplomovou práci, proto ji doporučuji k obhajobě a hodnotím známkou výborně.

K předkládané diplomové práci mám následující připomínky a dotazy a prosím autorku o jejich komentář:

- 1) V literárním přehledu v kapitole „Cirkadiánní rytmus tělesné teploty“ je uvedeno, že u savců dochází ke kolísání tělesné teploty v pravidelném denním rytmu o zhruba 1-4 °C. Má autorka informace, k jakým denním změnám tělesné teploty dochází u experimentálních myší, které jsou chovány v konstantních podmínkách tj. 23 °C?
- 2) Jak dlouho přežívají organotypické explantáty SCN v AIR médiu ve 37 °C? V záznamech rytmů Per2-bioluminiscence je již v rámci jednoho experimentu po několika dnech patrné výrazné snížení amplitudy cyklu (*damping*). Autorka uvádí, že explantáty byly používány i opakovaně 2-3x. Proč nebyly pro experimenty použity vždy „čerstvé“ vzorky?
- 3) Bylo experimentálně ověřeno, že u organotypických explantátů SCN držených dlouhou dobu v AIR médiu je zcela zastaven vývoj? Např. mohlo by u explantátů dojít k tvorbě synapsí?
- 4) Při aplikaci tří po sobě jdoucích teplotních cyklů nedošlo u explantátů s nízkou amplitudou a periodou delší než 24 hod k signifikantnímu zkrácení periody, zatímco u explantátů s nízkou amplitudou a kratší periodou k prodloužení periody došlo. Má proto autorka vysvětlení?
- 5) V diskusi je uvedeno, že citlivost fetálního SCN k teplotním změnám je zřejmě důsledek nedostatečně vyvinuté neurální sítě v SCN. Vyvinutá neurální síť pak zajišťuje odolnost cirkadiánních hodin k teplotním změnám v dospělém SCN. Má autorka nějakou hypotézu, jakým mechanismem, by vznik neurálních spojů mohl tuto odolnost zajistit? V diskusi autorka uvádí, že jedním z vysvětlení by mohla být nižší aktivita signalizační odpovědi teplotního šoku HSR, nicméně dříve zmiňuje, že tato dráha se uplatňuje i při teplotní kompenzaci výhradně na úrovni jednotlivých neuronů SCN.
- 6) Závěrem autorka uvádí, že získané výsledky otevírají prostor pro další výzkum vývoje SCN a mateřské synchronizace v *in vivo* podmínkách. Mohla by autorka blíže specifikovat jaké experimenty měla na mysli? Jaký je rozdíl v pojmech „*ex vivo*“ a „*in vivo*“?

V Českých Budějovicích dne 25.5.2025

.....

Mgr. Hana Sehadová, Ph.D.