

## Posudek oponenta na diplomovou práci

oponentský posudek

Jméno posuzovatele:

Martin Forman

Datum:

Autor: Karel Tejkal

Název práce: Úloha glukokortikoidů v cirkadiálním systému

### Cíle práce

Cíle práce jsou jasně definovány. Hlavním cílem bylo přispět k poznání úlohy glukokortikoidů v cirkadiálním systému savců. K dosažení hlavního cíle DP bylo vytčeno několik konkrétních, dílčích úkolů: detekce cirkadiálních hodin v jednotlivých podoblastech hipokampu potkana, zjištění jejich reakcí na odstranění nadledvin a režim omezeného krmení. Vliv těchto manipulací na cirkadiální hodiny v distálním kolonu. Dále byl studován vliv obsazení glukokortikoidních receptorů na zachování rytmicity exprese hodinových genů u vybraných buněčných linií.

### Struktura (členění) práce, odpovídá požadovanému? ANO

Rozsah práce (počet stran): 110 stran

Je uveden anglický abstrakt a klíčová slova, ANO

Je uveden seznam zkratek? ANO

Práce má standardní členění: úvod, přehled literatury, cíle DP, materiál a metody, výsledky, diskuze, souhrn a seznam použité literatury. Jednotlivé kapitoly jsou vhodně členěny do logických celků - podkapitol.

### Literární přehled:

Odpovídá tématu? ANO

Je napsán srozumitelně? ANO

Použil(a) autor(ka) v rešerši relevantní údaje z literárních zdrojů? ANO

Jsou použité literární zdroje dostatečné a jsou v práci správně citovány? ANO

Literární přehled čtivou a srozumitelnou formou uvede čtenáře do studované problematiky. Probrány jsou základní charakteristiky biologických rytmů, centra a mechanismy funkcí cirkadiálních rytmů savců i molekulární podstata biologických hodin. V souladu se zadáním DP je zvýšená pozornost věnována produkci glukokortikoidů a jejich funkci na biologické hodiny. Text je doplněn obrázky vhodně ilustrujícími probírané fenomény. Citovány jsou zdroje z relevantních odborných periodik (celkem práce obsahuje více než 150 zdrojů), které jsou řádně citovány.

### Materiál a metody:

Odpovídají použité metody experimentální kapitole? ANO

Kolik metod bylo použito?

V práci byli užity tři hlavní metody pro sledování exprese vybraných genů a sice ISH na preparátech tkáňových řezů, RT qPCR a analýza bioluminiscence Luc transfekovaných buněčných linií. Pro zdárné provedení těchto hlavních experimentů autor použil širokou škálu metod od standardizovaných chovů laboratorních zvířat, jejich operativní manipulaci přes metody histologické, analýzu obrazu, kultivaci buněčných linií až po statistickou analýzu. Hojně byly užity molekulárně biologické metody práce s nukleovými kyselinami (izolace RNA, práce s plazmidy, radioaktivní značení hybridizačních sond, PCR, reverzní transkripcí aj.). Celkové množství a rozmanitost metod považují za nadstandardní.

Jsou metody srozumitelně popsány? ANO

Všechny provedené metody jsou v práci detailně popsány, včetně uvedení přístrojového vybavení a použitých reagensů. Ačkoliv heslovitý postup nepovažují obvykle za šťastný svůj hlavní účel - reprodukovatelnost experimentu v tomto případě plní. Chybí mi jasná charakterizace použitých bun. linií, kterou autor postupně odhaluje v různých částech DP. V této kapitole se autor zcela nevyhnul jisté eklektičnosti, lepší struktura této kapitoly by prospěla snadnějšímu pochopení experimentálního designu DP. Vzhledem k rozsahu experimentů a jejich vzájemné provázanosti se ovšem nejedalo o lehký úkol a zvolená forma je akceptovatelná.

#### **Experimentální část:**

Je vysvětlen cíl experimentů? ANO

Je dokumentace výsledků dostačující? ANO

Postačuje množství experimentů k získání odpovědi na zadané otázky? ANO

Navržené metody jsou vhodné pro zodpovězení kladených otázek. Ke studiu byly zvoleny geny zastupující jednotlivé části regulačních smyček biologických hodin, což umožnilo postihnout obraz o expresi cirkadiánních hodin jako celku. V rámci experimentální části bylo získáno úctyhodné množství výsledků. Toto umožnil i důmyslný design experimentu, kdy byli např. kontrolní jedinci zároveň použiti k získání základních údajů o přítomnosti biologických hodin v hipokampu. Tento přístup zároveň minimalizoval množství použitých pokusných zvířat. Klíčové výsledky jsou dobře dokumentovány názornými grafy. Výsledky jsou v jednotlivých kapitolách přehledně sumarizovány. Chybí mi pouze vynesení kontrol a zvířat po adrenalectomii v obrázcích 13 a 14.

#### **Diskuze:**

Je opravdu diskuzí, nejde jen o konstatování vlastních výsledků? ANO

Jsou výsledky porovnávány s literaturou? ANO

Jsou uvedeny nějaké hypotézy či návrhy na další řešení problematiky? ANO

Diskuze je psána stručně a výstižně. Výsledky jsou konfrontovány s publikacemi, přičemž nechybí ani recentní zdroje (publikace z letošního roku). Autor kriticky hodnotí dosažené výsledky své i jiných autorů a nabízí možná vysvětlení případných nesrovnalostí. Na základě svých výsledků autor poukazuje na možné další směry výzkumu.

#### **Závěry (Souhrn) :**

Jsou výstižné? ANO

#### **Formální úroveň práce** (obrazová dokumentace, grafika, text, jazyková úroveň):

Po formální a jazykové stránce je práce na velmi slušné úrovni. Obrazová dokumentace je kvalitní doplněna vysvětlujícími popisky.

#### **Splnění cílů práce a celkové hodnocení:**

Vytyčené cíle práce byly ambiciózní, přesto se je autorovi podařilo splnit. Celkové množství provedené experimentální práce považují za nadstandardní. Autorovi se podařilo prokázat přítomnost cirkadiánních hodin v jednotlivých částech hipokampu a zjistit jejich reakci na podněty ovlivňující hladiny glukokortikoidů. Dále autor analyzoval expresi hodinových genů u dvou buněčných liniích v reakci na inaktivaci glukokortikoidních receptorů. Získané výsledky jsou ve velké míře unikátní a tvoří velmi solidní základ pro publikaci (nebo hned několik publikací) v impaktovaných časopisech. Práce celkově působí dobrým dojmem a jednoznačně doporučuji k obhájení.

**Otázky a připomínky oponenta:**

Chybí mi dokumentace jednotlivých „přípravných kroků a postupů“ at' už formou samostatné kapitoly ve výsledcích nebo alespoň zmínkou součásti kapitoly materiál a metodika (např. autor detailně popisuje postup stanovení míry inkorporace S-UTP a přitom neuvádí jakou míru inkorporace měli jím připravené sondy, ani přípustnou míru inkorporace).

Obr 5. podle mě patří spíše do výsledků, zde bych doporučil jednotnou orientaci řezů (C,D,E,F) na zvážení je i konfrontace s konvenčně barveným preparátem.

V práci postrádám informace o stavu poznání cirkadiálních rytmů v kolonu. Mohl by autor osvětlit současný stav poznání této problematiky a motivy, které vedly k výběru této tkáně pro experimenty?

Proč jsou na obr. 3 dva grafy, nestačil by pro ilustraci jen jeden?

Byla stanovena exprese per1 u sham skupiny v SCN?

Proč nebyla stanovena exprese i v jiných oblastech hipokampu (CA2, CA4), na snímcích jsou patrné?

Proč byla použita radioaktivně značená sonda, neposkytly by obdobnou službu fluorescenční sondy?

Soudíte na základě Vašich poznatků, že na jednotlivé oblasti hipokampu fungují rozdílně co do exprese hodinových genů, nebo lze na hipokampus v tomto ohledu nahlížet jako na „jednotlivou entitu“?

Návrh hodnocení oponenta (známka nebude součástí zveřejněných informací)

x  výborně  velmi dobře  dobře  nevyhověl(a)

Podpis oponenta: