

Posudek oponenta diplomové práce

Jméno a příjmení uchazeče/ky: Kateřina Jeřábková

Název práce:

VLIV DLOUHODOBÉHO PODÁVÁNÍ MORFINU NA OPIOIDNÍ RECEPTORY V
MOZKOVÉ KŮŘE POTKANA

A. Bodové hodnocení jednotlivých aspektů práce (označte právě jednu z možností)

1. Rozsah DP a její členění	
X	A - přiměřené, odpovídají charakteru DP a významu jednotlivých částí
	B - nevyrovnané, členění není logické nebo rozsah jednotlivých částí nekoresponduje s jejich významem
	C - uspokojivé, rozsah některých částí nedostačuje
	N - nedostatečné

2. Odborná správnost	
	A - výborná, bez závažnějších připomínek
X	B - velmi dobrá, s ojedinělými drobnými závadami (nejasnost výkladu, chyby ve vzorcích nebo chemických názvech, nedokonalý popis metod nebo výsledků)
	C - uspokojivá, s četnějšími drobnými závadami
	N - nevyhovující, s hrubými chybami

3. Uvedení použitých literárních a j. zdrojů	
X	A - bez připomínek, všechny převzaté údaje s citací zdroje, celkový počet citací odpovídá charakteru práce
	B - uspokojivé, s občasnými neobratnostmi zejm. v umístění odkazů, nebo s celkově nižším počtem citací
	C - s vážnějšími závadami, např. převažují "nestandardní" odkazy na učebnice, přednášky, webové stránky, nebo se ojediněle vyskytuje opominutí odkazu na zdroj převzatých dat
	N - nevyhovující, velmi málo citací, ev. rysy plagiátu (časté opomíjení odkazu na zdroj převzatých dat, popř. opsání velkých částí textu)

4. Jazyk práce	
	A - výborný, práce je napsána čtivě a srozumitelně, bez závažnějších gramatických n. pravopisných chyb
X	B - velmi dobrý, ojedinělé stylistické neobratnosti, gramatické n. pravopisné chyby
	C - uspokojivý, četnější slohové neobratnosti, gramatické n. pravopisné chyby, ojediněle se vyskytují obtížně srozumitelné n. nejednoznačné formulace
	N - nevyhovující, s četnými hrubými chybami

5. Formální a grafická úroveň práce	
	A - výborná, bez překlepů a chyb ve formátování
X	B - velmi dobrá, ojedinělé chyby formátu citací, překlepy, chybějící zkratky apod.
	C - uspokojivá, s ojedinělými většími (např. vynechání stránky) nebo četnějšími drobnými chybami
	N - nevyhovující, s četnými hrubými chybami

Případný slovní komentář k bodům 1. až 5.

Předkládaná diplomová práce si klade za cíl sledovat vliv dlouhodobého podávání morfinu na opioidní receptory v mozkové kůře potkana s využitím radioligandů, přičemž v první části se autorka věnuje optimalizaci metody pro izolaci preparátu plazmatických membrán pomocí Percollového gradientu.

Práce v celkovém rozsahu 68 stran je standardně členěna do jednotlivých tematických kapitol a podkapitol včetně abstraktu a v závěru uvedeném seznamu literatury.

Literární úvod pojednává o typech opioidních receptorů, jejich farmakologii, morfologii a lokalizaci, o průběhu signalizace a interakcích těchto receptorů. Je zpracován poměrně přehledně a jednotlivé oddíly práce na sebe logicky navazují. Chybí zde obecnější pojednání o receptorech spřažených s G-proteiny (GPCR) jako takových, neboť do této velké skupiny opioidní receptory patří. V kapitole o opioidních ligandech by pro úplnost bylo vhodné uvést nejen agonisty a antagonisty, ale zmínit se také o inverzních či parciálních agonistech. Naopak velmi podrobně je popsána struktura a biotransformace morfinu a alternativní sestřih RNA μ -opioidního receptoru.

Metodická část práce obsahuje dostatečně podrobný popis a složení použitých roztoků, postup práce při jednotlivých experimentech a postup při zpracování a statistickém vyhodnocení výsledků.

V kapitole popisující vazebné pokusy s radioligandy však není uvedeno, na jakém přístroji byla prováděna vakuová filtrace vzorků a chybí matematický popis kompetice, podle kterého je prováděna nelineární regrese a analýza měřených kompetičních křivek a zjišťováno procentuální zastoupení μ -opioidních receptorů v jednotlivých vzorcích membrán.

První část výsledků - optimalizace metody pro přípravu plazmatických membrán - je představena ve formě kvantitativního vyhodnocení detekovaných markerových proteinů na imunoblotu a jednobodového stanovení vazebných míst pro antagonistu opioidních receptorů v daných frakcích Percollového gradientu. Z těchto výsledků vyplývá vhodný způsob přípravy vzorků s minimální kontaminací plazmatických membrán mitochondriální frakcí. V další části jsou ve formě grafů naměřených křivek a tabulek prezentovány výsledky saturačních a kompetičních vazebných pokusů s radioligandy, které ukazují změny v množství (případně v afinitě) opioidních receptorů a procentuální zastoupení μ -opioidních receptorů v připravených vzorcích membrán v závislosti na době podávání morfinu pokusným zvířatům.

V diskuzi se autorka věnuje přehlednému shrnutí dosažených výsledků práce, jejich srovnáním s dostupnými literárními údaji a možnému vysvětlení případných odlišností. Autorka v diskuzi nezmiňuje výrazný bifazický průběh naměřených kompetičních křivek při zjišťování procentuálního zastoupení μ -opioidních receptorů v jednotlivých vzorcích membrán. V diskuzi (i závěru) je také uvedeno, že během podávání morfinu došlo k signifikantnímu zvýšení poměrného zastoupení μ -opioidních receptorů vzhledem ke kontrolní skupině (str. 62, str. 64), zatímco ve výsledcích na straně 52, v popisu k tabulce 9 autorka uvádí nárůst procentuálního zastoupení těchto receptorů jako nesignifikantní u pokusných skupin, kterým byl podáván morfin (vzhledem ke kontrole) (jde pravděpodobně o omyl).

Hlavní výsledky práce ukazují, že dlouhodobé podávání morfinu je provázeno snížením celkového počtu vazebných míst pro Diprenorphine (neselektivního antagonistu opioidních receptorů) v mozkové kůře potkana a zároveň je zvýšeno poměrné zastoupení μ -opioidních receptorů, disociační konstanty K_d a K_i se nemění. Po regresi dochází k dalšímu snížení počtu vazebných míst, poměr zastoupení μ -opioidních receptorů se vrací na úroveň kontrolní skupiny.

Celková formální a grafická úprava práce je velmi dobrá a odpovídá požadavkům na diplomovou práci. Vyskytuje se zde relativně málo překlepů a pravopisných chyb, lze vytknout např. anglický popis zkratk u obr. 8, který byl převzat ze zahraničního zdroje – v česky psané práci by podle mého názoru tyto popisky měly být uvedeny česky (případně latinsky, pokud se jedná o zavedené označení). Také je třeba uvést na pravou míru název kmene použitých potkanů, který by měl být správně označen jako „Wistar“ nikoli „Whistar“, jak autorka opakovaně uvádí. Citace literárních zdrojů jsou uvedeny v dostatečné míře, v přehledu použité literatury bych

preferovala vypsání všech autorů a nikoli zkráceného tvaru „Novák and others“, který je zde používán v případě více autorů článku.

Přes uvedené připomínky lze říci, že autorka splnila zadané cíle diplomové práce. Je třeba také ocenit časovou náročnost práce z hlediska provedení všech experimentů.

Tuto diplomovou práci doporučuji k obhajobě a navrhuji klasifikaci velmi dobře.

B. Obhajoba

Dotazy k obhajobě

- 1) Které z uvedených experimentů, metod a postupů jste prováděla Vy osobně - tj. včetně aplikace morfinu a izolace mozkové kůry z pokusných zvířat?
- 2) V metodické části jsou popsány 4 způsoby homogenizace vzorků tkáně při přípravě plazmatických membrán pomocí Percollového gradientu – zkoušeli jste také různé doby centrifugace, ev. jinou hustotu Percollu či vyšší pH izolačního pufru pro lepší oddělení mitochondriální frakce od frakce plazmatických membrán?
- 3) Můžete podrobněji vysvětlit zjištěný výsledek, proč v i době abstinence nadále klesá ve vzorcích membrán počet opioidních receptorů?
- 4) Jak byste interpretovala jasně bifazický průběh naměřených kompetičních křivek při vytěšňování neselektivního antagonisty opioidních receptorů Diprenorphine kompetitorem DAMGO – selektivním agonistou μ -opioidních receptorů?

Stanovisko k opravě chyb v práci:

opravný lístek/oprava v textu **JE** / **(NENÍ)** (zakroužkujte) podmínkou přijetí práce

C. Celkový návrh

Práci doporučuji k přijetí k dalšímu řízení: **(ANO)** / **NE**

Navrhovaná celková klasifikace: velmi dobře

Datum vypracování posudku: 24. 5. 2012

Jméno a příjmení, podpis oponenta :

RNDr. Lenka Roubalová, Ph.D.