

Oponentský posudek na magisterskou diplomovou práci Bc. Ivety Bartoňové

„Vliv morfinu na expresi a distribuci alfa a beta podjednotek trimerních G-proteinů v myokardu potkana“.

Cílem diplomové práce bylo analyzovat hladiny sledovaných heterotrimerních G-proteinů v srdečním svalu při dlouhodobém podávání morfinu a ověřit také potencionální kardioprotektivní účinky chronického působení morfinu při navozené ischemii myokardu laboratorního potkana.

Předložená diplomová práce je standardně členěna do jednotlivých tematických kapitol a podkapitol, včetně úvodu a závěru. Rozsah práce je 65 stran včetně seznamu použité literatury, z čehož teoretický úvod má 18 stran, použitá metodika je popsána na 12 stranách, výsledkům a diskuzi je věnováno 15 stran.

Literární přehled je zpracován poměrně přehledně a shrnuje informace o opioidních receptorech a heterotrimerních G-proteinech včetně jejich klasifikace, signálních drah a vysvětlení pojmu a procesu desenzitizace. Další část pojednává o morfinu a opioidních látkách obecně. Závěr teoretického úvodu je věnován popisu ischemie myokardu, jejím projevům a důsledkům a možným kardioprotektivním účinkům opioidů.

Cíle práce jsou formulovány přehledně, avšak poměrně velmi stručně.

V praktické části práce je uveden způsob, jakým byla prováděna aplikace morfinu různým skupinám laboratorních zvířat podle velikosti dávky a délky podávání, dále je popsána metoda pro studium citlivosti myokardu ke vzniku infarktu – model srdce *in situ* a postup stanovení velikosti infarktu u sledovaných skupin zvířat. V další části je popsána izolace plasmatických membrán ze vzorků srdeční tkáně na percollovém gradientu, separace membránové frakce a cytosolu a metoda identifikace jednotlivých tříd G-proteinů technikou imunoblot a jejich kvantifikace v připravených vzorcích.

Výsledky provedených experimentů jsou prezentovány ve formě imunoblotů detekovaných G-proteinů ve vzorcích srdce sledovaných skupin zvířat. Kvantitativní vyhodnocení blotů je zpracováno v několika grafech, které ukazují vliv působení morfinu na distribuci podjednotek G-proteinů u jednotlivých skupin experimentálních zvířat. V další části jsou ukázány výsledky analýzy vlivu dlouhodobého podávání morfinu na rozsah poškození při navozené ischemii myokardu.

V diskuzi se autorka věnuje přehlednému shrnutí dosažených výsledků práce, jejich srovnáním s dostupnými literárními údaji a možnému vysvětlení případných odlišností.

Výsledky práce ukazují, že dlouhodobé podávání morfinu neovlivnilo expresi sledovaných podjednotek G-proteinů v plasmatických membránách izolovaných z myokardu potkana s výjimkou mírného snížení hladiny G_{α} proteinu. Významným se jeví potvrzení možnosti kardioprotektivního účinku morfinu v závislosti na dávce a délce podávání. Je třeba také ocenit časovou náročnost diplomové práce z hlediska provedení všech experimentů.

Připomínky:

Formální úroveň práce je relativně dobrá a odpovídá požadavkům na diplomovou práci, překlepy a gramatické chyby se prakticky nevyskytují, některé formulace a slovní spojení jsou však poněkud neobratné či nejasné. Dále lze vytknout anglický popis v některých použitých obrázcích, které autorka převzala ze zahraničních zdrojů – v česky psané práci by podle mého názoru tyto popisky měly být uvedeny česky. Rovněž při odkazu na literaturu by měl být používán v češtině tvar „Novák a kol.“, případně „...a spol.“, nikoli „Novák et al.“.

V teoretickém úvodu se vyskytuje několik nepřesností, např.:

str. 13 - u kappa opioidních receptorů jsou známy 3 podtypy nikoli pouze 2 a není uvedeno, v které části CNS se tyto receptory vyskytují.

str. 13 - nesprávné označení jednoho z agonistů kappa opioidních receptorů, správně je U69593.

str. 15 - formulace „Doba aktivity G-proteinů vyvolaná vytvořením jednoho komplexu ligandu s receptorem je přibližně 10 sekund“ – chybí zde odkaz na citovaný zdroj a není úplně jasné, co přesně chtěla autorka říci, protože většina údajů o kinetice G-proteinové aktivace uvádí data v rádech desítek až stovek milisekund.

V metodické části při popisu izolace membrán lze doporučit uvádět údaje o rychlosti centrifugace v násobcích tíhového zrychlení „g“ a nikoli v otáčkách, neboť není uveden průměr používaného rotoru. V popisu metody pro stanovení obsahu bílkovin chybí vysvětlení zkratky „BCA“ – bicinchoninová kyselina (tato není uvedena ani v seznamu zkratk obecně) a metoda není popsána dostatečně úplně, např. u použitých roztoků A, B a C je uvedena pouze navážka v mg, ale nikoli objem připravovaných roztoků. Z didaktického hlediska by také bylo vhodné vysvětlit princip metody. V metodice chybí podrobnější popis měření frekvence komorových arytmií v průběhu ischemie.

Při popisu aplikace morfinu autorka neuvádí, kolik zvířat bylo použito v jednotlivých experimentálních skupinách. Tento údaj se nenachází ani v části popisující výsledky experimentů. Také údaje o tom, jakým způsobem bylo provedeno statistické zpracování výsledků, jsou pouze obecné nebo neúplné, např. při kvantifikaci podjednotek G-proteinů je uvedeno: „Výsledky byly získány ze tří nezávislých pokusů“, ale již není specifikováno, které pokusy má autorka na mysli – zda se např. jednalo o 3x opakovanou izolaci membrán nebo o 3x provedený imunoblot z jedenkrát připravených membrán. U experimentů sledujících vliv morfinu na odolnost myokardu vůči ischemii není uvedena velikost testovaných souborů hodnot vůbec – např. počet srdcí, počet řezů.

Přes uvedené připomínky lze říci, že Bc. Iveta Bartoňové splnila zadané cíle diplomové práce. Tuto diplomovou práci doporučuji k obhajobě a navrhuji klasifikaci velmi dobře.

V Praze 2. 9. 2011

RNDr. Lenka Roubalová, Ph.D.

Dotazy k obhajobě:

- 1) Víte, podle čeho byly odvozeny názvy mí, delta a kappa 3 typů opioidních receptorů?
- 2) Z jakého důvodu byly zvoleny právě dávky 1mg a 10mg/kg/den při aplikaci morfinu laboratorním potkanům?
- 3) Které z uvedených experimentů, metod a postupů jste prováděla Vy osobně – vzhledem k časové náročnosti práce?
- 4) Jak si vysvětlujete odlišnost ve vlivu chronické stimulace morfinem na velikost infarktu, kdy bylo zaznamenáno signifikantní snížení poškození při podávání morfinu v délce 28 dnů, na rozdíl od výskytu ischemických arytmií, kdy došlo významnému snížení při aplikaci morfinu po 10 dnů, avšak při aplikaci po 28 dnů toto snížení výskytu arytmií vymizelo?