

Oponentský posudek na magisterskou práci

Lucia Paušlyová (2013)

Synchronizace periferních cirkadiálních hodin během ontogeneze

Předkládaná magisterská práce se věnuje expresi vybraných hodinových genů (*Per1*, *Per2*, *Bmal1* a *Rev-erba*) v periferních tkáních (játra, distální kolon a srdce) potkana kmene SHR (spontánně hypertenzní potkan) během časné postnatální ontogeneze a expresi těchto genů ve fibroblastech izolovaných z embryí a dospělých jedinců potkana kmene Wistar a SHR. V experimentech s fibroblasty je studována možnost synchronizace jednotlivých hodinových genů 60minutovou inkubací s dexametazonem.

Hodnocení výsledků z hlediska tvůrčího přínosu

Nejpřínosnější částí předkládané práce je, dle mého názoru, vývoj denních profilů exprese genů *Per1*, *Per2*, *Bmal1* a *Rev-erba* v játrech, distálním kolon a srdci potkana kmene SHR během postnatální ontogeneze, což otevírá cestu k dalšímu výzkumu možných vztahů mezi změnami na úrovni cirkadiálních hodin (centrálních i periferních) a rozvojem spontánní hypertenze u potkanů kmene SHR, případně rozvojem hypertenze obecně.

Formální kvalita předloženého spisu

Po vizuální stránce je předkládaná práce pečlivě zpracovaná. Formátování nadpisů, odstavců a popisků k obrázkům je jednotné v celé práci. Autorka se bohužel nevyvarovala drobných chyb z nepozornosti, tak typických pro závěrečné práce, jako jsou překlipy, záměny písmen a vynechaná písmena (např. str. 7 - sontánně, str. 11 - enodgenní), chybějící mezery (především v kapitole Materiál a metody mezi hodnotou a jednotkou, např. str. 46 - 15min, 15ml, 5min, 1000rpm, 10ml, 1.5ml, 5ml), desetinná tečka místo čárky, chybějící horní index při označení knock-out zvířat (*Bmal1*-/-; ve všech případech) nebo chybějící čárky a tečky, i když takových případů bylo velmi málo. V celé práci se těchto drobných chybiček nahromadilo příliš mnoho a mělo by se to projevit na výsledném hodnocení.

Jazyk

Přestože český jazyk není rodným jazykem autorky, je práce z pohledu jazyka velmi pěkná a celkový dojem zbytečně kazí výše a níže uvedené nedostatky. Jediným, a to ještě zřídka se vyskytujícím, prohřeškem byl anglický slovosled (např. str. 30 - "... SCN-řízeným rytmem ..." místo rytmem řízeným SCN).

Hodnocení částí předkládaného spisu

Literární přehled

Literární přehled má 29 stran, je logicky členěn a je doplněn 5 převzatými či upravenými obrázky, které jsou formálně správně citovány. U obrázků 1-3 by možná místo "převzato ze" mělo být "upraveno podle", protože obrázky jsou počestěné. V seznamu použité literatury je uvedeno 158 zdrojů, které pokrývají období od roku 1960 do roku 2013. Zdroje jsou citovány ve formátu Autor 2013, Autor et al. 2013 nebo Autor & Autor 2013. Formátování není zcela

jednotné a opakovaně se před rokem objevuje čárka (např. Autor, 2013). Kromě toho některé citace v textu neodpovídají seznamu použité literatury nebo v seznamu dokonce chybí. Celkem se jedná o 18 publikací. Na rozdíl od formálních nedostatků považuji toto za zásadní pochybení, a proto doporučení diplomové práce k obhajobě podmiňuji odevzdáním Errata před termínem konání obhajoby. Navzdory těmto nedostatkům nemám žádné výhrady k obsahové stránce literárního přehledu a považuji jej za zdařile napsaný. Možná bych jen přehodil podkapitoly 2.7 (Ontogeneze cirkadiálního systému savců) a 2.6 (Spontánně hypertenzní potkan a jeho cirkadiální systém) a poslední kapitolu (podkapitolu) literárního přehledu bych poupravil tak, aby z ní jednoznačněji vyplývaly cíle formulované v následující kapitole. Po přečtení práce mi totiž nebylo zcela jasné, proč byly vybrány zrovna tyto periferní tkáně, tyto geny nebo proč byl první měřený věk P1 a ne P2, což by lépe odpovídalo citovaným publikacím.

Cíle diplomové práce

Cíle diplomové práce jsou formulovány věcně a srozumitelně.

Materiál a metody

Tato část má 14 stran a z jejího rozsahu je patrné, že si autorka osvojila široké spektrum experimentálních metod. Způsob zpracování formou dílčích protokolů je pro mě trochu netradiční, ale ruší výrazně méně než množství překlepů, které se v této kapitole vyskytují. Z celého textu je tato kapitola celkově nejslabší.

Statistická analýza

Tato kapitola obsahuje 4 rovnice, které však nejsou řádně očíslované. První 3 rovnice představují, resp. by měly představovat, matematické řešení aritmetického průměru, směrodatné odchylky (SD) a střední chyby průměru (SEM). Rovnice jsou zapsané jako sada znaků na jednom řádku bez horních nebo dolních indexů, což do rovnic obsahujících zlomky a mocniny (odmocniny) vnáší zmatek. Uniká mi smysl uvedení těchto rovnic a uvítal bych spíše odkaz na software, který byl ke zpracování dat použitý. Poslední rovnice popisuje sinusoidu, kterou se prokládají data z cirkadiálních experimentů a používá se k tzv. kosinorově analýze. Rovnice má v této kapitole své místo, ale měla by být řádně označena a měl by na ní vést odkaz v textu. Měla by být také přeložena do češtiny. Všechny 4 rovnice uvedené v této kapitole bych doporučoval v adekvátní podobě vložit do Errata.

Výsledky

Výsledky předkládané práce jsou prezentovány na 16 stranách s pomocí 6 obrázků, přičemž každý obrázek je složený z více grafů. Struktura výsledků odpovídá stanoveným cílům a s ohledem na jejich jednoznačnou formulaci zde pravděpodobně nezbylo příliš prostoru pro kreativitu. Tato kapitola proto působí velmi stroze a vzhledem k velkému objemu dat a zvolenému dávkování je kapitola obtížněji stravitelná. U této kapitoly však musím vyzdvihnout, že jsem v ní narazil pouze na 3 drobné chyby z nepozornosti, a to v popisu obr. 7 (4 -5; mezera navíc) v popisu obr. 9 (chybějící závorka za slovem body) a na str. 72 přebývající „a“ v 1. řádku 2. odstavce. O to víc zářející a nepochopitelný je počet chyb v předchozí kapitole.

Diskuse

V diskuzi se autorka snaží na 10 stranách interpretovat získaná data a porovnává je přitom s výsledky dřívějších experimentů prováděných jak přímo týmem paní dr. Sumové, tak též zahraničními pracovišti. Diskuze dle mého názoru trochu trpí jedinečností získaných výsledků. I přes to se však autorka snaží formulovat hypotézy vysvětlující rozdíly mezi staršími a nově získanými poznatky, které se týkají především rozdílů mezi kmeny SHR a Wistar.

Celkové hodnocení předkládaného spisu

Dle mého názoru práce splňuje požadavky kladené na diplomovou práci a v případě dodání navrhovaných Errat do termínu obhajoby do SISu a v papírové podobě k vložení do svázaných prací ji doporučuji k obhajobě.

Další připomínky k práci a otázky do diskuse

Kromě výše uvedených připomínek se musím vyjádřit také k neúplnosti seznamu zkratk a k ne zcela bezchybnému používání zkratk v textu. V seznamu zkratk je uvedena přibližně polovina zkratk vyskytujících se v textu. Většina chybějících zkratk připadá na izoformy genů a proteinů (např. *Cry1*, *Cry2*, CRY1 a CRY2) a jejich homology (např. *mCry1*, mCRY1 nebo *hPer2*). Týká se to však i jiných zkratk jako např. ANOVA, *c-fos*, DNA, RNA, S.E.M. a další. Zkratka RT je v metodické části práce používána ve významu pokojová teplota, ale v seznamu zkratk je definována jako reverzní transkriptáza. V seznamu zkratk není u všech položek český popis a není v něm naznačena konvence používaná pro rozlišení genů a proteinů. Z tohoto důvodu bych doporučoval do Errat vložit i nový seznam zkratk. Drobnou výtku bych měl i k zavádění zkratk, kdy byly některé zkratky v textu používány dříve než byly definovány jako v případě bHLH, DNP, Dex, FXBL3, HLF, PAS a TEF.

V označení knock-out myši by měl být používán horní index ($mPer1^{-/-}$).

V předkládané práci je označení genu *Rev-erba* v textu i v obrázcích používáno v několika dalších variantách (*Rev-erb-a*, *Rev-erbA*, *Rev-erb α*, *Rev-erba*).

V práci není uvedeno, jakým post-hoc testem jste mezi sebou porovnávali akrofáze a amplitudy u jednotlivých skupin.

U jednoho genu a jednoho orgánu používáte v P1-P30 rozdílné škály na ose y, což zhoršuje orientace v datech (např. v obr. 6). V prezentaci doporučuji upravit.

1. Proč jste neměřili i potkany v dospělém věku, abyste dokončili celou vývojovou řadu?
2. Proč jste měřili právě tyto 4 geny v těchto konkrétních periferních orgánech?

3. Má smysl zaokrouhlovat na 1 desetinné místo průměrné hodnoty akrofází, při použitém sámplovacím kroku (4 hod)? Nestačilo by zaokrouhlení na celé číslo?
4. Některé proložené sinusoidy jdou do záporných hodnot (obr. 6 a 8). Lze toto proložení považovat za validní, když takovýto rytmus v reálné situaci nemůže existovat?
5. Jak si vysvětlujete vymizení rytmicity u exprese genu *Per1* v játrech u skupiny P30 v porovnání s kmenem Wistar?
6. Jak je to s expresí GR v ontogenezi u fibroblastů?
7. Proč jste pro synchronizaci fibroblastů nezkusili jiný již zaběhnutý stimul jako např. v diskuzi zmiňovaný forskolin?

Mgr. Miroslav Hock, Ph.D.

V Praze dne 12. 9. 2013