

## OPONENTSKÝ POSUDEK DOKTORSKÉ DISERTAČNÍ PRÁCE

pro získání PhD v rámci Doktorského studia v biomedicíně v OR č. 10  
Farmakologie a toxikologie

**Autor práce:** Mgr. Petr Škopek

**Název práce:** „Vliv stresu na expresi některých neuropeptidů a jejich receptorů v srdci a CNS, za využití biochemických a imunofluorescenčních postupů“

**Pracoviště:** Laboratoř Neurofarmakologie ÚLBLD, 1. LF a VFN, Univerzita Karlova v Praze

**Školitel:** Doc. MUDr. Věra Klenerová, DrSc.

**Školitel-konzultant:** Prof. MUDr. Sixtus Hynie, DrSc.

**Oponent:** Prof. MUDr. Jaroslava Dušková, CSc.

### Obecná charakteristika práce:

Mgr. Petr Škopek řeší ve své disertační práci velmi aktuální a důležité téma, které má význam jak z teoretického, tak i potenciálně praktického hlediska. Zabývá se úlohou neuropeptidů, což je oblast jen ojediněle řešená v současném farmakologickém výzkumu. Disertační práce vychází ze tří publikací Mgr. P. Škopka otištěných v časopisech s impakt faktorem a dalších prací autora.

Předložená disertační práce má adekvátní formu i obsah. Skládá se ze 138 stran textu včetně 72 obrázků a 4 tabulek, 150 referencí, a je doplněna autoreferátem a seznamem publikací, které byly podkladem pro sepsání předložené disertace. Je členěna dle běžně používaného způsobu psaní vědeckého díla, tj. do kapitol Úvod, Hypotézy a Cíle práce, Materiál a Metody, Výsledky, Diskuse, Závěry a Použitá literatura.

### Zhodnocení disertační práce:

V obsažném a informativním **úvodu** autor uvádí do řešené problematiky, kterou člení do 6ti oddílů: behaviorální studie, stress, neuropeptidy, oxytocin a oxytocinový receptor, atriální natriuretický hormon a galaninergní systém. Je přehledně shrnuta problematika neuropeptidů, jak obecně, tak konkrétně u oxytocinonergního a galaninergního systému. Názorná schémata a instruktivní obrázky umožňují dobrou orientaci v řešené problematice. Další část úvodu se týká stresu, který v autorově výzkumu slouží jako experimentální nástroj pro ovlivnění regulací především v CNS, ale i receptorů v dalších orgánech, kde působí hlavní studované neuropeptidy, kterými jsou oxytocin a galanin.

V následující kapitole autor jasně definuje **pracovní hypotézy** pro vlastní výzkum, ze kterých pak jednoznačně vyplývají stanovené **cíle** vlastní výzkumné práce.

Rozsáhlá **metodická část** jasně ukazuje, co vše musel autor zvládnout, aby mohl předložit výsledky v prezentovaném rozsahu. Metodická sekce popisuje zevrubně použitá zvířata a zdůrazňuje možnost využití potkanů s odlišnou aktivitou HPA osy. Vzhledem k tomu, že v experimentální části autoři použili odlišné tkáně pro sledování exprese mRNA a exprese proteinů příslušných genů, bylo nutné vypracovat specifické postupy pro odběr tkání, tj. srdeční oddíly a komponenty hypofýzy. V textu disertace jsou zevrubně uvedeny behaviorální studie, které vycházejí z předchozích prací pracoviště v této oblasti výzkumu. Autor velmi výstižně popsal metodu animálního modelu akutního imobilizačního stresu, který je používán na školícím pracovišti po řadu let, a pracoval podle protokolu schváleného příslušnou komisí na 1.LF UK. Disertant zavedl novou metodu imunohistochemického stanovení genové exprese sledovaných cílových proteinů, především imunofluorescenční detekci. Paralelně se

studiemi prováděnými imunofluorescenčně vypracoval imunohistochemickou techniku využívající křenovou peroxidázu. K potvrzení specificity používaných protilátek zavedl metodu Western Blot.

**Výsledky** tvoří převážnou část disertační práce a jsou umístěny na 60ti stranách. Jsou rozčleněny do 5ti částí. V první části jsou uvedeny výsledky z **behaviorálních studií**, kde je nutné vyzdvihnout zcela prioritní zjištění antistresového a anxiolytického účinku galaninu po systémovém podání, který byl potvrzen současným podáním různých antagonistů.

V další části výsledků se autor zabývá působením **neuropeptidů v srdci**, kde opět uvádí zcela prioritní výsledky. Potvrzuje na základě identifikace oxytocinového receptoru v různých oblastech srdce jeho zařazení mezi kardiovaskulární hormony. Velmi zajímavý je výsledek o pohybu oxytocinového receptoru z plasmatické membrány do jádra. Výsledky získané v pokusech s atriálním natriuretickým peptidem jsou v souladu s literárními údaji. Další prioritní nález je identifikace galaninu, galanin like peptidu a galaninergních receptorů v srdci, dosud v literatuře nepopsaný.

V kapitole sledující **neuropeptidy v jednotlivých oddílech hypofýzy**, je výborně popsána úloha oxytocinového a galaninergního systému a především velmi dobře zpracovaná část věnovaná kolokalizačním studiím jednotlivých sledovaných proteinů. Velmi mne zaujala kolokalizace adenohypofysárních hormonů, především ACTH s jednotlivými peptidy.

Je třeba vyzdvihnout detekci oxytocinového receptoru v supraoptickém jádře hypotalamu pomocí **chiméry oxytocinu s imunofluorescenčním markerem**, která byla syntetizována na pracovišti autora. Z ekonomického i odborného hlediska je třeba ocenit **syntézu používaných peptidů**, což znamenalo velký finanční přínos, bez kterého by nemohly být provedeny popsané experimenty.

Ve velice zdařilé a rozsáhlé **diskusi** autor vychází ze známých literárních údajů, které diskutuje ve vztahu k vlastním výsledkům a nálezům. Uvádí reprezentativní literární přehled včetně citací z roku 2013 a zvláště se věnuje přehledovým článkům. Na základě vlastních hypotéz ukazuje na některé ojedinělé nálezy a na směr výzkumu v této oblasti.

Je možno konstatovat, že jde o velmi kvalitně zpracovanou disertaci, pro jejíž zpracování bylo nutné zvládnout mnoho nových metod. Po formální stránce je disertace velmi dobře zpracována, jednotlivé části jsou jasně formulovány, jsou srozumitelné a psané dobrým jazykem. Plánované cíle a dosažené výsledky odpovídají záměrům a hypotézám. K vlastní disertaci nemám žádných kritických poznámek a výhrad.

**Hlavní předností práce je komplexní experimentální přístup se zvládnutím mnoha nových postupů a doplnění poznatků o neuropeptidech, které v literatuře dosud chyběly.**

#### **Připomínky oponenta:**

Drobné formální nebo jazykové nedostatky, které nesnižují úroveň práce, mohou být odstraněny při případném využití částí textu pro další publikace:

- V seznamu zkratk některé chybí: ( ANT 99, ANT FL, BNP, NPR –A,B,C...), i když jsou vesměs vysvětleny při prvním užití v textu, pokud čtenář význam pozapomene, měl by je beze zbytku v úvodním seznamu nalézt.
- Kde český ekvivalent zkratky není odvoditelný ve shodě s anglickým termínem, doporučuji uvést anglický slovní zdroj zkratky a posléze český užívaný ekvivalent
- Ve vysvětlení zkratky neužívat další zkratku (viz TMD – OF)
- DAPI - 4',6-diamidino-2-phenylindole ( v textu 4',6-diaminidno-2-fenylindol)
- DTT – Dithiothreitol ( v textu Dithitretol)

- Užití „y“ v přičestí po podmětu s životným skloňováním (antagonisté inhibovaly) je problémem hodným Ústavu pro jazyk český...
- Termín grooming navrhuji přeložit v shodě s předchozími (panáčkování) - sebepečovávání?
- Text obr. 4 na str.21 vyžaduje redakci (IMO –imobilizaci; 2x potkanů SD a LE)

Určité vylepšení by představovalo shrnutí některých výsledků do tabulky, což by bylo i vylepšení pro případnou publikaci těchto zajímavých výsledků.

**Rozsah disertační práce ( i autoreferátu) je větší než obvykle;** to však lze snadno zdůvodnit provázaností sledovaných témat, jakkoli by vymezené úkoly a získané výsledky postačovaly pro současné disertace 2-3 kandidátů. Větší stránkový rozsah je dán i hodnotnou obrazovou a schémata tvořenou dokumentací, která zvyšuje jednoznačně srozumitelnost odborně náročného textu.

**Po stránce obsahové** oceňuji v práci velmi dobře **algoritmicky vymezené dílčí cíle**, které odpovídají nosným trendům výzkumné laboratoře v níž byla dizertace vypracována; v těchto dílčích formulovaných cílech bylo vždy **dosazeno hodnotných a často prioritních výsledků**. Ty zároveň otvírají celou řadu otázek pro zaměření dalšího výzkumu.

**Rozvíjené výzkumné téma má řadu potenciálních praktických aplikací.** Zcela mimo pochybnosti jsou otázky ovlivnění stresu; stejně však představuje velmi slibný směr i studium možných vlivů GalLP v regulaci příjmu potravy a dalších hormonálních regulací.

#### **Dotazy oponenta:**

- 1) Přítomnost GalR3 ve Western blot technice (obr.35) je slabá až nedokumentovatelná, zatímco v imunofluorescenčním průkazu ( obr.38) se jeví jako poměrně silná ( orproti GalR1 a 2, které ve Western blotu mají detekovatelnou linii). Plánujete ověření těchto výsledků nějakou další technikou?
- 2) Výsledky kolokalizačních studií v adenohipofýze interpretujete jako předpokládaný vliv Gal a GalLP v sekreci hormonů, zejm. ACTH. Existují studie o přítomnosti Gal a GalLP v nadledvině kůře?

#### **Závěr:**

**Na základě předložené disertace a doplňujících materiálů konstatuji, že doktorand prokázal, že je schopen samostatné vědecké práce a doporučuji komisi, aby Mgr. Petrovi Škopkovi byl po úspěšné obhajobě udělen titul PhD. za jménem; schválení doktorské disertace a udělení titulu plně schvaluji.**

**V Praze 11.09.2013**

Prof. MUDr. Jaroslava Dušková, CSc. FIAC  
 Ústav  
 Studijní  
 12800