

Oponentský posudek disertační práce Mgr. Petra Nováka
„Determinace a regulace exprese těžkých řetězců myozinu a proteinů vážících vápník v pomalých a rychlých svalech potkana“

Disertační práce obrací pozornost k funkční morfologii kosterního svalstva na subcelulární úrovni se zvláštním zřetelem k metabolické a funkční heterogenitě svalových vláken (jejichž určujícím faktorem jsou především rozdíly těžkých řetězců myozinu, myosinové isoformy). Tato heterogenita svalových vláken se stala východiskem pro jejich klasifikaci.

Morfologické, metabolické a funkční odlišnosti mezi jednotlivými typy svalových vláken zastoupených ve svalu, respektive v motorické jednotce, mají svůj odraz např. v synchronizaci, či asynchronizaci stahu daného svalu, přesněji různých typů svalových vláken tvořících motorickou jednotku a podílejí se na kvalitě svalového stahu (smooth contraction).

Disertační práce Mgr. Petra Nováka je přínosným příspěvkem ke studiu myogenických faktorů podílejících se na regulaci exprese specifických charakteristik svalových vláken.

Cíle disertační práce:

1. Analýza endogenních a exogenních faktorů (individuálních, věkových, sexuálních a mezikmenových rozdílů) ovlivňujících variabilitu složení svalových vláken.
2. Studium vlivu pozměněné funkce štítné žlázy na expresi proteinů vážících kalcium (kalsequestrinu, paralbuminu a fosfolambanu).
3. Posouzení spolehlivosti metod užitých k hodnocení změněné funkce štítné žlázy.

Rozsah a grafická úprava disertace:

Předložená práce obsahuje 69 stran textu včetně seznamu použitých zkratk, 12 grafů, 2 tabulek, 7 obrázků a 6 stránkového suplementu. Práce je psaná v angličtině. Grafická úprava disertační práce je dobrá.

Práce je rozložena do 8 oddílů, kapitol, včetně anglického a českého souhrnu.

Úvod:

Úvodní kapitola je věnována literárnímu přehledu, který informuje o současném stavu řešení dané problematiky, což je doloženo 141 citacemi (viz přehled použité literatury), z toho 22 odkazů bylo publikováno v letech 2005 až 2009, 4 odkazy jsou z roku 2010, jde o práce autora disertace.

Seznam použité literatury doplňuje přehled publikací autora disertace, celkem 9 publikovaných prací. Jde o 4 postery, 2 souhrny sdělení z mezinárodních kongresů 3 původní vědecké publikace „in extenso“.

Metody:

Zvolené metodické postupy jsou adekvátní pro řešení stanovených cílů. Vycházejí z aktuální nabídky moderních metod vhodných pro řešení zvolené problematiky. Použité laboratorní metody byly detailně popsány.

Výsledky :

1. Byly analyzovány funkčně morfologické charakteristiky svalových vláken m. soleus a m. extensor digitorum longus z 99 potkanů imbredního kmene Lewis obojího pohlaví ve stáří od 3 do 19 měsíců.

Studie potvrdila signifikantní rozdíly ve složení m. soleus, nižší procento výskytu vláken typu I, u mladých jedinců (stáří cca 3 měsíce) oproti starším potkanům. Tyto rozdíly se týkají obou pohlaví.

Co se týče EDL je signifikantní snížení výskytu vláken typu 2A a zvýšení výskytu vláken 2B, ale pouze u samic.

2. Sexuální difference ve výskytu svalových vláken typu 2A a 2B byla prokázána pouze u EDL ve stáří cca 3 až 14 měsíců. U samic je signifikantní snížení počtu 2A a 2B oproti stavu EDL u samců.

Vlákna m. soleus nevykazují žádné sexuální rozdíly.

3. Hladiny vápník vázících proteinů, kalsekvestrinu (CSQ), parvalbuminu (PA) a fosfolambanu (PhL), jsou ovlivňovány mimo jiné, pozměněnou funkcí štítné žlázy. Hyperfunkce zvyšuje hladinu CSQ a PA, hypofunkce snižuje jejich hladinu v kosterních svalech. Fosfolamban u hypofunkce štítné žlázy je ve zvýšené míře exprimován jen v m. soleus a srdeční svalovině. Tyto změny se odrážejí ve zvýšeném obsahu MHC 1beta izoformy, jež je provázený poklesem jeho kontraktálních charakteristik.

4. Potvrdilo se, že chronické změny funkčního stavu štítné žlázy ovlivňují aktivitu glycerol-3-fosfát cytochrom c oxidoreduktázy (GPDH) u zvířat obojího pohlaví a sledování těchto změn spolu se sledování některých anatomických parametrů může sloužit jako kritérium pro posouzení funkčního stavu štítné žlázy.

5. Získané výsledky byly konfrontovány s existujícími literárními údaji.

Připomínky

Přes celkové pozitivní hodnocení předložené disertační práce mám následující kritické připomínky

1. Seznam použitých zkratk je neúplný.

2. Nečíslovaný seznam literárních citací znesnadňuje orientaci.

3. Vzhledem k tomu, že štítná žláza je jedním z orgánů, které mimořádně citlivě reagují na podmínky zevního prostředí a kvalitu potravy zvláště co se týče obsahu jodu, bylo by vhodné definovat přesněji, co se rozumí termínem „complete laboratory diet“.

4. V anglickém textu jsou použity některé méně obvyklé výrazy a vyskytují se překlepy.

5. Některé grafy jsou provedeny v malém měřítku a ztrácí tím na přehlednosti.

6. Zařazení zvířat do skupin ve vztahu ke stáří pokusných zvířat bylo provedeno velmi benevolentně. Minimální směrodatná odchylka O , 4 měsíce to je cca 12 dnů, zejména ve skupině velmi mladých zvířat v období intenzivního růstu (stáří 3 měsíce) může nepochybně ovlivnit homogenitu získaných výsledků.

7. Nejsou uvedena konkrétní data dokumentující změny hladin hormonů štítné žlázy a anatomických parametrů, jako je například hmotnost štítné žlázy, osvětlující stupeň alterace štítné žlázy.

Otázka k autorovi disertace:

Máte nějakou představu o mechanismu vlivu funkčního stavu štítné žlázy na změny charakteristik svalových vláken?

Jaký způsobem a jaké úrovni mohou tyreoidní hormony ovlivnit expresi těžkých řetězců myozinu, či vápník vázících proteinů?

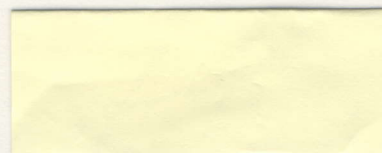
Jak si vysvětlujete sexuální rozdíly sledovaných parametrů?

Závěr:

Práci hodnotím kladně. Přináší řadu nových validních informací vycházejících z vlastní experimentální práce a z práce vědeckého týmu, jehož je členem, které vhodně rozšiřují sumu současných poznatků týkajících se typizace svalových vláken, a vhodným způsobem konfrontuje současné aktuální poznatky dané problematiky se staršími literárními údaji.

Autor disertační práce Mgr. Petr Novák ve spolupráci se svými spolupracovníky publikoval své výsledky v impaktovaných časopisech, nebo prezentoval na zahraničních vědeckých fórech. Prokázal schopnost samostatné vědecké práce, schopnost kriticky hodnotit své vlastní výsledky a konfrontovat je s literárními údaji, zvládl náročné metodické pracovní postupy.

Předložená disertační práce splňuje požadavky kladené na doktorskou disertační práci, a proto doporučuji práci k obhajobě. Na základě úspěšné obhajoby pak doporučuji, aby Mgr. Petru Novákovi byl udělen akademický titul doktor (Ph.D dle Zákona o vysokých školách č.111/Sb.



9. prosince 2010

Doc. MUDr. Jiří Luža, CSc.
Ústav fyziologie LF UP Olomouc

Posudek na práci Mgr. Petra Nováka „Determination and regulation of myosin heavy chain and calcium binding protein expression in slow and fast rat muscles“.

Práce je napsána v anglickém jazyce v standardní formě a zabývá se změnami struktury typických zástupců pomalých a rychlých svalů laboratorního potkana s věkem zvířete a pod vlivem tyroidních hormonů. Členění práce je standardní. Po obsahu a seznamu zkratk následuje stručný úvod, který se zabývá tříděním různých typů svalových vláken a vlivem tyroidních hormonů na regulaci vnitrobuněčného vápníku ve svalech. Jsou rozebrány klady a zápory různých metodik rozpoznávání svalových vláken a rozdíly v zastoupení rychlých a pomalých svalových vláken ve svalech mezi různými kmeny laboratorního potkana. Expres různých proteinů, které se podílejí na vnitrobuněčném chelátování vápenatých kationtů je porovnávána u různých typů kosterního svalu i ve svalu srdečním. Jako nejdůležitější jsou zmíněny calsequestrin, parvalbumin a phospholamban, kterými se pak autor zabýval v experimentální části.

Cíle práce jsou stanoveny jasně.

V metodické části jsou shrnuty všechny použité metody. Některé metody práce jsou ale uvedeny jen velmi stručně s odkazem na publikované články. Je škoda, že jako příloha práce nejsou uvedeny původní publikace.

Hlavní výsledky práce jsou rozděleny do dvou oddílů. V prvním oddílu jsou shrnuty výsledky analýzy zastoupení typů svalových vláken podle druhu svalu, věku a pohlaví zvířete. Studie byla prováděna na typickém „pomalém“ svalu soleus a typickém „rychlém“ svalu extensor digitorum longus laboratorního potkana kmene Lewis. Ve druhém oddílu jsou studovány změny vyvolané změnou tyroidního stavu zvířete. Byly zjišťovány změny v zastoupení svalových vláken a změny v proteinech pufrujících vnitrobuněčný vápník. Třetí část práce shrnuje kontrolní parametry, kterými byly ověřovány důsledky tyroidního stavu. Byly zvoleny koncentrace a aktivita enzymu glycerolfosfát dehydrogenasy, koncentrace tyroidních hormonů a relativní hmotnost štítné žlázy a srdce.

V diskusi jsou rozebrány zjištěné rozdíly ve složení svalů z hlediska jejich variability, věku, pohlaví, kmene zvířat a tyroidního stavu. Práce je v příloze doprovázena rozsáhlými tabulkami, které číselně srovnávají získané experimentální výsledky s údaji z literatury. Hlavní výsledky práce byly publikovány ve dvou článcích v mezinárodních recenzovaných časopisech a v šesti příspěvcích na konferencích. Jeden článek je v recenzním řízení.

Výsledky práce obsahují nová experimentální data. To, že již publikované výsledky prošly recenzním řízením v mezinárodních časopisech dokazuje, že použité metody, získané výsledky i jejich interpretace odpovídají uznávaným standardům a výsledky jsou aktuální a cenné. Zadané cíle práce byly splněny. Mám jen připomínku k formální stránce předkládané práce. Text práce je psán velmi stručně a zejména v metodické části je popis metod neúplný, s odkazy na publikované články, které ale nejsou součástí práce. To čtenáři ztěžuje i porozumění některým výsledkům, protože podmínky některých experimentů jsou v textu práce uvedeny neúplně.

Autor prokázal schopnost samostatné tvořivé vědecké práce a splnil požadavky proto doporučuji udělení titulu PhD.

V Praze dne

17.12 2010

RNDr. Jan Krůšek, CSc.

Připomínky a otázky:

Str. 28, 29 a 30. K jakému signálu byla normalizována kvantifikace parvalbuminu a phospholambanu? Je uvedeno, že signál je normalizován k „expression of CBB“ a k glyceraldehyd phosphate dehydrogenase. Vyjádření „expresse CBB“ nedává smysl. U hypotyroidních zvířat je výrazný rozdíl v expresi stanovené oběma metodami u kosterních svalů, zatímco při stanovení v srdci je zjištěná hodnota shodná. V každém případě by měla být podrobně vysvětlena metoda kvantifikace. Nebylo možné ke kvantifikaci použít signál jiného proteinu?

Předpokládá se, že při změnách zastoupení vláken vyvolaných při různém tyroidním stavu se mění biochemie již existujících vláken, nebo stará vlákna zanikají a vznikají nová vlákna nového typu?

Byla u zvířat se změněným tyroidním stavem pozorována nějaká změna v pohybové aktivitě, která by mohla souviset s nalezenými změnami na svalech?

Str. 33 Jak bylo normalizováno stanovení množství GPDH v játrech? Bylo stanovováno absolutně – v celých játrech, na váhu jater, na obsah celkových proteinů nebo jinak?

Zkratka MyHC není uvedena v seznamu a pravděpodobně je záměnou za zkratku MHC.