



---

## **Posudek diplomové práce Bc. Josefa Večeři „Endocrine regulation of antioxidative stress in the red firebug *Pyrrhocoris apterus*“**

---

Předložená diplomová práce zpracovává na 49 stranách anglického textu velmi aktuální problematiku oxidativního stresu u hmyzu včetně experimentální části o antioxidačním vlivu dvou vybraných hormonů. Diplomová práce, jak sám autor uvádí, je vytvořena na základě dvou manuskriptů přijatých do tisku v renomovaných zahraničních časopisech, tj. anglický text i prezentované výsledky již prošly recenzním řízením a tím pádem prokázaly svou kvalitu. Na druhou stranu sloučením dvou manuskriptů pro účely diplomové práce se autor dopustil řady nepřesností a výsledná práce je potom v některých místech nejednotná jak obsahově tak formálně (viz mé připomínky dále).

V teoretickém úvodu se autor zabývá přehledem reaktivních forem kyslíku a jejich účinkem na organismus. Následuje standardní členění diplomové práce, kapitoly jsou přiměřeného rozsahu, závěry jsou jasně formulované a autor prokázal schopnost práce s odbornou literaturou. Práce přinesla cenná experimentální data, která jsou v mnoha ohledech originální. Z práce vyplývá, že endokrinní systém má i další funkce spojené např. s oxidačním stresem, kde hormony působí antioxidačně. O kvalitě výsledků svědčí jejich prezentace na třech mezinárodních konferencích a dva manuskripty z diplomové práce vycházející.

### K práci mám následující dotazy a připomínky:

- Nejvíce připomínek mám k obrázkům, které jsou značeny jednak dvojitě termíny „Picture“ i „Figure“ a jejich číslování neodpovídá pořadí v textu (např. začínáme s „Picture 4“ na str. 13, obr. 1 je až na straně 22). Navíc jsou řazeny až na konci práce (jako Supplement 1), což je obvyklé pro manuskripty ale pro diplomové práce nepřijatelné (navíc i po přijetí manuskriptu se obrázky objeví v časopise na jejich správném místě u výsledků a ne na konci). U obrázků značených jako „Pictures“ nejsou uvedeny citace odkud byly převzaty, i když je převzato jejich původní číslování i legenda! V okopírované legendě Picture 5 se také objevují další citace.
- Zkratka pro Paraquat (PQ) včetně jeho chemického složení se objevuje až na straně 18, i když je používána již od strany 13, není vysvětlena zkratka OS (oxidační stres), jako

zkratku pro 20-hydroxyecdysone bych navrhoval 20-HE místo 20-E, celkově by práci pomohl seznam použitých zkratek.

- Název *Pyrrhocoris apterus* se objevuje nejprve ve zkratce (str. 14, poté na str. 17 v plném znění včetně L., u detailního popisu materiálu ale zase L. chybí).
- Str. 15 – vliv 20E na proteiny hemolymfy atd. (uvedené i v souhrnných výsledcích na straně 30) – tyto výsledky nejsou v práci zahrnuty (předpokládám že se na nich podíleli ostatní spoluautoři manuskriptů), najít se dají podle autora „in attached papers“, připojeny v Supplement 2 jsou ale pouze citace posterů nebo článků „in press“, tj. pro čtenáře poměrně nedostupné zdroje, stejně tak se na přiložené články odvolává autor na str. 17 - místo odkazu na články „in press“ je sem mohl přímo vypsát.
- Hypotézy a metodiky pro oba použité hormony jsou psané nejednotně.
- Proč se liší stáří použitých jedinců pro experimenty s 20E (4 dny) a s AKH (10 dní)?
- Str. 18 – nejprve je u kontrol zmíněn „saline“ a teprve později se dozvídáme že se jedná o „Ringer saline“.
- Str. 21-22 – problémy se zarovnáním textu do bloku.
- Seznam literatury – nejednotné používání zkratk křestních jmen autorů (s tečkou, bez tečky, čárka před atd.), míchání dlouhých a krátkých názvů časopisů.
- Na závěr otázka - jaký je vztah oxidačního stresu k měnícím se hladinám hormonů? Během vývoje hmyzu se totiž cyklicky objevují dvě maxima obsahu ecdysteroidů v hemolymfě (nejprve apolýza a poté ekdyse), mění se tedy i jejich antioxidační funkce...

Výše uvedené nedostatky zcela evidentně vznikly spojením dvou manuskriptů psaných různou formou, pokud má ale diplomová práce vystupovat jednotně, je nutné brát ohled i na tyto věci. I přes tyto připomínky je celá diplomová práce Josefa Večeři dle mého názoru nadstandardní zejména díky úplné publikaci výsledků. Práce splňuje všechny požadavky kladené na tento typ práce, proto ji **doporučuji ke schválení a klasifikaci známkou - výborně.**

V Brně 21.5.2007

RNDr. Pavel Hyršl, Ph.D.

**Endocrine regulation of oxidative stress in the red firebug *Pyrrhocoris apterus***

Předkládaná diplomová práce je rozsahem přiměřená. Po přehledně zpracované literární rešerši v úvodu práce následují kapitoly popisující použitý materiál a metodiky pro jednotlivé typy pokusů, výsledková kapitola, diskuse získaných výsledků s literárními prameny a na závěr práce přehledné shrnutí získaných výsledků. Rozsah i struktura jednotlivých částí diplomové práce jsou vyvážené.

Hlavním cílem předkládané práce bylo popsat případné antioxidační účinky adipokinetického hormonu a 20-hydroxyekdysonu u ploštice *Pyrrhocoris apterus* v podmínkách oxidativního stresu, vyvolaného injekcí herbicidu paraquat.

Úvodní teoretická část diplomové práce je zpracována přehledným a podrobným způsobem. K jejímu vypracování bylo použito množství monografií i odborných článků, publikovaných vesměs v posledních 10 letech. Autor prokázal výbornou orientaci v problematice reaktivních metabolitů kyslíku, jejich úlohy ve fyziologických a patofyziologických procesech, v problematice antioxidačních obranných mechanismů a možnostech jejich ovlivnění hmyzími hormony.

Z metodické části práce je zřejmé, že autor nastudoval a zvládl celou řadu náročných metodik, které dokázal aplikovat pro svoje experimentální uspořádání řešení zadaného úkolu. Rozvoj oxidativního stresu v tkáních byl monitorován pomocí spektrofotometrického stanovení látek reagujících s kyselinou thiobarbiturovou (nespecifické stanovení malondialdehydu a dalších lipidových metabolitů) a proteinových karbonylových skupin v centrální nervové tkáni a v hemolymfě. Vliv vybraných hormonů na antioxidační status v centrální nervové tkáni a v hemolymfě byl studován pomocí stanovení obsahu redukováného glutathionu, aktivity gama-glutamyl transpeptidasy a tzv. celkové antioxidační aktivity.

Z výsledkové části vyplývá, že autor splnil vytčené cíle práce. Celkově lze konstatovat, že předložená práce přinesla několik zajímavých výsledků potvrzujících a rozšiřujících současné znalosti v dané oblasti. Jako nejzajímavější přínos práce hodnotím porovnání antioxidačních účinků studovaných hormonů na rozvoj oxidativního stresu v závislosti na pohlaví modelového organismu a zjištění, že samci jsou k rozvoji oxidativního stresu náchylnější než samice.

Získané výsledky jsou diskutovány v závěrečné části práce s použitím moderních dostupných literárních zdrojů. O významu celé práce svědčí to, že získané výsledky byly průběžně prezentovány na mezinárodních vědeckých konferencích a byly použity pro přípravu dvou rukopisů odborných článků, připravených k opublikování v mezinárodních vědeckých časopisech.

K práci mám následující připomínky a dotazy:

1. Autor se při psaní diplomové práce nevyhl celou řadě formálních chyb a nedostatků či terminologických nepřesností. V celé práci používá pro superoxidový radikál zjednodušený termín „superoxide“ namísto přesnějšího a výstižnějšího termínu „superoxide anion radical“. Rovněž použitá chemická značka pro

superoxidový radikál ( $O_2^{\cdot-}$ ) vystihuje pouze jeho aniontovou, ne však radikálovou povahu. Správné označení superoxidového radikálu ( $O_2^{\cdot-}$ ) se v celé práci vyskytuje pouze v rovnici 17 na str. 11.

2. Jako poměrně nešťastné považuji nadměrné používání zkratk (např. i pro jednoslovné termíny nebo termíny, které se v textu nevyskytují často). Všechny zkratky musí být rovněž v místě jejich prvního použití v textu vysvětleny (což neplatí např. pro zkratku PTTH na str. 14, PQ na str. 15). V případě tak masivního používání zkratk by navíc celé práci prospělo zařazení abecedního seznamu zkratk.
3. Rovněž doporučuji jednotné používání názvu modelového organismu. V textu se střídavě objevuje ve formě *Pyrrhocoris apterus* a *P. apterus*. Alespoň v metodické části popisující použitý modelový organismus by navíc mělo být latinské jméno organismu doplněno o jméno autora uvedeného latinského názvu, tedy *Pyrrhocoris apterus* (L.).
4. U ilustračních obrázků („PICTURES“) chybí odkazy na zdroje těchto obrázků. Navíc v samotných naskenovaných obrázcích mnohdy zbývá i jejich původní označení a číslování, což interferuje s číslováním obrázků, dokumentujících vlastní výsledky diplomanta („FIGURES“).
5. V čem podle autora spočívají antioxidační vlastnosti superoxid dismutasy? Samotná SOD katalyzuje dismutaci superoxidového aniontového radikálu na peroxid vodíku, který díky své nižší aktivitě a snadné dostupnosti přes biologické membrány může prostorově rozšiřovat oxidativní stres z místa vzniku primárních reaktivních metabolitů kyslíku a sloužit jako substrát pro myeloperoxidasu, což vede k tvorbě nejreaktivnějšího z kyslíkových radikálů - hydroxylového radikálu.
6. Jsou podle autora rostliny živé organismy nebo složky neživé přírody? Viz druhý odstavec na str. 13: „...apparent increase of ROS not only in plants but also in living organisms and ...“.
7. Neprovedl nebo neplánuje autor nějaké pokusy, zaměřené na stanovení přímých antioxidačních účinku studovaných hormonů?

#### Závěr

Přednesené připomínky nijak nesnižují kvalitu předložené diplomové práce. Diplomant prokázal, že je schopen pracovat s odbornou literaturou, řešit zadaný problém vědeckými metodami a získané výsledky vhodnou formou prezentovat. Předkládaná práce splnila zadané cíle a splňuje nároky kladené na práci tohoto druhu. Vzhledem k důvodům uvedeným výše doporučuji, aby byla diplomová práce přijata k obhajobě.

V Brně 21. 5. 2007

RNDr. Milan Číž, Ph.D.

Biofyzikální ústav AV ČR, Brno