



Prof. RNDr. Dalibor Kodrík, CSc.
Biologické centrum v.v.i, AV ČR
Entomologický ústav
Branišovská 31
370 05 České Budějovice
Telefon: přímá linka 387 775 271, ústředna 387 771 111
Fax: 385 310 354, E-mail: kodrik@entu.cas.cz

Posudek na magisterskou práci Jindřišky Tomáškové - **Vliv chronicky podávaných subletálních dávek parakvatu na délku telomer a rezistenci vůči oxidačnímu stresu drozofily**

Předkládaná práce studuje úlohu oxidačního stresu vyvolaného aplikací parakvatu na genetické, vývojové a fyziologické charakteristiky u mušky octomilky. Práce má klasické členění, které se od takové studentské magisterské práce očekává. Autorka získala zajímavý soubor dat, který zapadá do zaměření její mateřské laboratoře. Tento pozitivní dojem nicméně částečně kazí vlastní zpracování a provedení práce. Obsahuje řadu formálních prohřešků – text je často nejednotný, autorka přeskakuje od jednoho problému ke druhému a zase se k němu vrací (Úvod), některé podkapitoly pojednávají o něčem jiném, než indikuje nadpis (Výsledky) a text obsahuje řadu vět, které buď fakticky, nebo formálně nedávají smysl.

K práci mám následující připomínky a poznámky (na většinu není třeba reagovat):

- zkontroluje předposlední větu Anotace – nějak mi nedává smysl vztah enzymů a AKH
- str. 1, poslední věta kap. 1.1 – bez varování je tam zmínka o reaktivních formách dusíku bez dalšího vysvětlení
- str. 1 dole – nejsem fyzikální chemik, ale myslím, že jsou zde nepřesnosti např. molekulární kyslík je ve zmíněné souvislosti spíše atomární kyslík
- str. 3 dole – špatná citace: fakt, že corpora cardiaca jsou endokrinní žlázou nelze přisuzovat práci Velki a kol., 2011
- str. 4 - poslední věta prvního odstavce nedává smysl – plyne z ní, že řada funkcí AKH spadá pod anti-oxidační mechanismy, což není pravda
- str. 5 – je zde řada zkratk, které nejsou vysvětleny buď vůbec (HTT) nebo až po následném použití (TAHRE)
- str. 7 – Cíle práce – první polovina textu patří do Úvodu
- str. 8, kap. 3.3 Aplikace letální dávky parakvatu – popisuje hodnocení mortality nikoliv aplikaci parakvatu, ta je popsána v předchozí kapitole.
- str. 8, kap. 3.4 Rezistence vůči hladovění – nedostatečný popis toho, jak se pokus prováděl.
- str. 9, kap. 3.6 – je zde několik vět, které jsou buď špatně formulované, nebo nedávají smysl („Vzorky extrahované...“; „96-ti mikrotitrační destička...“; „Po blokování...“). Na druhé straně zde chybí údaje kolik CNS bylo použito na stanovení AKH a jaké dávky syntetického AKH byly použity na kalibrační křivku.
- str. 9, dole – věta ...larvy se přenesly na živné médium, kde se vylíhly... nedává smysl
- str. 10, první odstavec, poslední věta ...pomocí nanodropu. To je slangový výraz, bylo by třeba uvést název přístroje.
- Výsledky – u všech grafů jsou uvedeny na x-ové ose dávky parakvatu sestupně, což je nelogické. U grafu 1 chybí na ose x popis, u grafu 4 na ose y jednotky. Slovo „starvace“ v názvu kapitoly 4.3 zní v českém textu hrozně. Kapitola 4.4 nepopisuje „Působení hormonu AKH na oxidační stres“ ale Vliv parakvatu na hladinu AKH. V kap. 4.3 se popisuje mortalita,

ale příslušný graf ukazuje přežívání, což je nepraktické.

- str. 15 dole špatná citace u popisu AKH jako antioxidačního faktoru. Tato role AKH byla popsána poprvé v roce 2007, takže citace z roku 1997 a 2001 nejsou relevantní

- Diskuse - v celé kapitole mi chybí diskuze o telomerách. Konec Diskuse je hodně rozpačitý, jako by už autorce docházely síly. Dále u citace práce Gáliková (2015) (správně má být Gáliková a kol., 2015) chybí údaj o tom, že se pracovalo na Drosophila. Předposlední věta „Ve shodě...“ moc nerozumím.

- Použitá literatura - není psána úplně jednotně, u některých citací se objevuje číslo ročníku u jiných ne. U citace známého časopisu PNAS USA se objevují dokonce 4 různé formy zápisu (viz Allsopp vs. Rashkova vs. Reddy vs. Scarborough).

Dotazy:

1. Jsou dlouhé telomery vázány na řád Diptera? Jaké je jejich délka u savců ve srovnání s hmyzem?
2. Proč byli ke všem pokusům požití pouze samci?
3. Jaký je názor autorky na to, že hladina transkriptů HeT-A je nejvyšší po aplikaci PQ v koncentraci 1.6×10^{-4} mM, ale vyšší a nižší dávky PQ jsou méně účinné?
4. Obr. 4, AKH obsah v CNS – Jaké jsou zde jednotky pro hladinu AKH? Ukazují opravdu chybové úsečky SD a ne SEM? Překvapuje mě, že rozdíl kontroly a dávky PQ není při 5 opakováních průkazný. Možná se ale pletu.
5. Proč není u výsledků vlivu AKH na hladinu Het-A uveden graf? Popište prosím přesně, jak pokus probíhal, hlavně kolik uplynulo doby od ošetření AKH po zpracování vzorků.
6. Je známo něco o vlivu jiných toxinů/hormonů než jsou PQ/AKH na délku telomer u hmyzu (příp. i u savců?) Prosím o komentář.

Závěr:

Autorka zpracovala aktuální problematiku, zvládla řadu biochemických a molekulárně-biologických metod a shromáždila zajímavý soubor dat. Nicméně úlohou oponenta je posoudit i formální stránku práce, která pokulhává za získanými daty. Práci doporučuji k obhajobě jako jeden z podkladů k získání magisterského titulu a hodnotím ji známkou „velmi dobře“.

Č. Budějovice, 13. 1. 2017



Dalibor Kodrík - oponent



Posudek oponenta na diplomovou práci

Autorka práce: **Bc. Jindřiška Tomášková**

Název práce: **Vliv chronicky podávaných subletálních dávek parakvatu na délku telomer a rezistenci vůči oxidačnímu stresu drozofily**

Ve své diplomové práci se Bc. Jindřiška Tomášková věnuje vlivu oxidačního stresu a adipokinetického hormonu, jehož zapojení v antioxidantních procesech hmyzu již bylo na pracovišti studentky dříve prokázáno, na vznik rezistence vůči vysokým dávkám paraquatu a délku života spojenou s délkou telomer. Vzhledem k pozitivnímu vlivu subletálních dávek kyslíkových radikálů na délku telomer, který i studentka sama ve své práci pozorovala, je téma práce velmi zajímavé z hlediska objasnění spojitostí mezi oxidačním stresem a kontrolními mechanismy řídicími vývoj živočichů.

Hlavní cíle, které si autorka v práci vytyčila, se podařilo beze zbytku splnit. Byl jasně prokázán vliv subletální dávky kyslíkových radikálů na prodloužení délky vývoje drozophil, zvýšení rezistence vůči letálním dávkám paraquatu a zvýšení hladiny adipokinetického hormonu. Negativní vliv oxidačního stresu byl pozorován na množství líhnoucích se jedinců a odolnost dospělců vůči hladovění nebyla stresem nijak ovlivněna. V neposlední řadě pak bylo úkolem autorky zjistit, zda aplikace AKH může přímo ovlivnit délku telomer, což se nepotvrdilo. Z hlediska zvolené a zvládnuté metodiky nelze autorce práce nic vytknout. Prostor pro zlepšení nacházím ovšem v popisu experimentů v metodické části práce, kde by bylo vhodné uvést např. stáří sameček *D. melanogaster* použitých k testu hladovění a dlouhodobého přežití nebo přidat krátkou kapitulu o statistickém zpracování výsledků. V rámci popisu kompetitivní ELISA se pak koncentrace 1:10000 týká spíše IgG protilátky v pufru, ne pufru samotného jak vyplývá z textu.

Největší problém vidím ve stylistickém zpracování práce, protože se v ní vyskytuje poměrně velké množství chyb a nesouvislostí textu (např. velmi kostrbaté souvětí v druhém odstavci na str. 6 týkající se funkce telomerické čepičky), které zbytečně narušují čtivost práce a snižují její celkovou úroveň. Autorka čerpala téměř výhradně z anglicky psané odborné literatury, což může být příčinou některých chyb, proto je na místě věnovat větší pečlivost správnému podání načtených informací. Na druhou stranu více než 90 použitých zdrojů považuji za nadstandardní množství pro tento typ prací a je chvályhodné, že se autorka snažila zjistit o studované problematice co nejvíce.

Výhrady mám dále k celkové délce práce čítající 16 stran textu včetně grafů a krátký odstavec věnovaný závěru, která dle mého názoru odpovídá spíše práci bakalářské. Vzhledem ke stručnosti práce v ní mohla autorka uvést i grafické výsledky z testu rezistence vůči hladovění a měření hladiny Het-A po aplikaci AKH, i když je v textu zmíněno, že zde nebyly zjištěny signifikantní rozdíly. V rámci diskuze pak mohla autorka rozvést např. svoji představu o budoucím výzkumu



dané problematiky a nastítnit tak perspektivy studia telomerické aktivity ve spojitosti s oxidačním stresem.

Menší doporučení mám k ostatním grafům, kdy by bylo přehlednější uvádět data v pořadí podle zvyšující se koncentrace paraquatu (tj. po kontrole bez paraquatu by následovala jeho nejnižší koncentrace např. 10^{-6}) a na ose y u obr. 3 je vhodnější uvést maximum 100 %. Data týkající se odolnosti vůči letální dávce paraquatu jsou jednou popisována jako procenta mortality, jindy jako procento přežívání. Pro přehlednost by bylo lepší toto sjednotit. Výsledky vylihnutých much (Obr. 2A), pak neodpovídají procentům popsaným v textu na str. 11.

Celkově je však diplomová práce Bc. Jindřišky Tomáškové na dobré úrovni, přináší nové poznatky a zaslouží si doporučení k obhajobě. Vzhledem k výše zmíněným nedostatkům a především délce práce navrhuji hodnocení známkou C. Komisi prosím, aby byly při hodnocení zohledněny formální požadavky na diplomové práce platné na přírodovědecké fakultě Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích.

K diplomové práci mám tyto dotazy:

- 1) kapitola 3.2: Jaké časové rozmezí bylo zvoleno pro sběr vajíček použitých pro testování délky vývoje a líhnutí na potravě s paraquatem? Nemohla doba sběru ovlivnit výsledky měření doby vývoje, u které se rozdíly mezi skupinami pohybují v rámci několika hodin? Byl vliv paraquatu patrný i na množství kukel v pokusných skupinách a lze tedy zhodnotit i mortalitu larev ve vztahu k indukovanému oxidačnímu stresu?
- 2) kapitola 3.4 a 3.5: Jak staří samečci byli použiti pro sledování rezistence vůči hladovění a dlouhodobého přežití? Bylo stáří samců vždy stejné nebo se testovaly mouchy různě staré?
- 3) Jaké byly výsledky testu dlouhodobého přežívání samečků, kteří byli potomky much chovaných po 12 generací na potravě se subletální dávkou paraquatu? Nepodařilo se mi je v práci najít, i když je tento experiment zmíněn v metodice (kapitola 3.5).
- 4) Jaká je vlastní představa autorky o mechanismu propojení mírného oxidačního stresu s prodlužováním telomer?

Oponent práce: **Mgr. Pavel Dobeš, Ph.D.**

V Brně 6.1.2016



datum a podpis