



Posudek diplomové práce Bc. Tomáše Zdobinského „Studium systému oxidativní fosforylace u vzácných typů mitochondriálních onemocnění“

Předkládaná diplomová práce Bc. Tomáše Zdobinského představuje výsledky původního biomedicínského výzkumu zaměřeného na studium funkčních a morfologických změn mitochondrií ve fibroblastech pacientů s poruchou oxidačně fosforylačního aparátu.

Hodnocení výsledků z hlediska tvůrčího přínosu

Práce je založená na porovnání primárních linií kožních fibroblastů získaných z pěti kontrol a osmi pacientů s mitochondriálními poruchami způsobenými mutacemi v sedmi různých jaderných genech. Přestože výsledky vyžadují další analýzu, mohou se stát základem k vytvoření referenčních parametrů, které se mohou uplatnit při studiu a diagnostice mitochondriálních onemocnění.

Formální kvalita diplomové práce

Formálně je práce velmi dobrá s výjimkou drobného nedostatku v obsahu, kde chybí odkazy na přílohy.

Jazyk

Práce je psána česky, gramaticky správně. Jediný prohřešek je v obrázku č.1, kde je místo správného výrazu „mezimembránový prostor“ použit „intermembránový prostor“.

Hodnocení částí diplomové práce

Teoretický úvod

Tato část shrnuje širokou oblast týkající se jak mitochondriální genetiky, dynamiky a funkce, tak mitochondriálních onemocnění. Autor zpracoval přibližně 300 citací a pro lepší orientaci jsou zde uvedeny i sekundární zdroje. Vzhledem k prezentovaným výsledkům v této části chybí shrnutí poznatků o proteinech kódovaných geny NR2F1 a HTRA2, o jejichž funkci se podrobně píše až v diskuzi. Dalším drobným nedostatkem je nedostatečně popsany princip Clarkovy kyslíkové elektrody – není zde zmíněno, že mezi katodu a anodu je přivedeno napětí, bez něhož by redukce kyslíku na vodu neproběhla.

Materiál a metody

Popis metodik je dostatečně podrobný pro přesné pochopení experimentálního postupu studenta, s výjimkou kapitoly „Respirometrické měření“ (3.2.3.2), kde není uvedena informace o množství buněčného proteinu, případně poměr buněčného proteinu vůči detergentu (digitonin). Tato informace je nezbytná pro optimální permeabilizaci buněk a tedy i pro reprodukovatelnost měření.

Výsledky

Autor prezentuje výsledky v 10 přehledných grafech, které dokumentují jak vliv věku na respiraci kontrolních buněk, tak rozdíly v respiraci buněk z věkově srovnatelných kontrol a pacientů. Všechna měření jsou provedena ve dvou kultivačních podmínkách – za přítomnosti glukózy nebo galaktózy, kdy by mělo docházet ke zvýšení aktivity oxidační fosforylace. Grafy jsou doplněny 12 přílohami obsahujícími naměřená data, ze kterých autor v grafech vychází. Pro lepší představu by bylo vhodné ukázat alespoň vybranou křivku z měření a z hlediska publikovatelnosti výsledků by bylo užitečné v grafech uvést jednotlivá měření. V části zabývající se studiem morfologických změn mitochondrií by bylo vhodné použít kvantitativní metodu na vyhodnocení fragmentace/elongace mitochondrií.

Diskuze

Tato část je velmi obsáhlá a dokládá autorův přehled v dané problematice. Autor zde prokázal schopnost kriticky zhodnotit svá měření a porovnat je s literaturou.

I přes drobné výtky se domnívám, že Bc. Tomáš Zdobinský se v zadané problematice dobře zorientoval a že jeho práce přinesla vědecké poznatky, na jejichž získání měl klíčový podíl. Proto dle mého názoru předkládaná diplomová práce splňuje nároky k udělení magisterského titulu.

K práci mám následující dotazy:

1. Jaké experimenty byste navrhl pro objasnění chování mitochondrií ve fibroblastech kultivovaných 5 dní v médiu s galaktózou? Uvažovali jste o prodloužení kultivace fibroblastů v médiu s galaktózou na delší dobu než 5 dní?
2. Mohl byste objasnit, z jakého důvodu jste stanovoval parametr FCCP/OXPHOS, kdy hodnota rozpřážené respirace (maximální kapacita respiračního řetězce) je narozdíl od kapacity oxidační fosforylace měřena s komplexem I inhibovaným rotenonem? Podle mého názoru tento parametr vypovídá o schopnosti buňky využívat respirační řetězec během fosforylace ADP pouze s použitím stejných substrátů.
3. Existuje vhodná metoda pro kvantitativní vyjádření morfologie mitochondrií?
4. V diskuzi jste nastínil, že by bylo vhodné respirometrická měření doplnit ještě jinými metodami. Mohl byste specifikovat jakými?

V Praze dne 11.9. 2019

RNDr. Alena Pecinová, PhD.

Odd. bioenergetiky
Fyziologický ústav AV ČR, v.v.i.