

Oponentský posudek diplomové práce Bc. Michaely Markové: **Expres vybraných defektů oxidativní fosforylace na úrovni kultivovaných fibroblastů.**

Předkládaná diplomová práce je zaměřena na optimalizaci metod, zejména pak vysoce citlivé polarografie pro výzkum a charakterizaci různých, s mitochondriemi a energetickým metabolismem spojených chorob. Ze zjevných etických a také technických důvodů, se jako optimální tkáň pro biochemickou charakterizaci metabolismu pacientů, jeví kultivované fibroblasty. I když tyto buňky mají celou řadu nevýhod, které autorka pěkně shrnuje, zdá se, že je to to nejlepší co v současnosti máme. Proto se autorka pokusila stanovit možnosti tohoto modelu pro diagnostiku chorob spojených s mitochondriemi, ať již primárně či sekundárně. Měla k dispozici fibroblasty ze dvou desítek pacientů, které proměřila z hlediska fungování systému oxidační fosforylace. Kromě oxygrafických měření autorka uvádí ještě další data získaná pomocí spektrofotometrického stanovení enzymové aktivity, elektronové a fluorescenční mikroskopie, ale není vždy jasné, jaký měla autorka podíl na získání těchto výsledků. Přínos práce je nepochybný, výsledky jsou důležité jak z hlediska klinické praxe pro detekci a případnou terapii mitopatií, tak z hlediska základního výzkumu, neboť právě mitochondriální poruchy badatelům umožňují zkoumat proces biogeneze komplexů oxidační fosforylace i úlohu různých pomocných proteinů.

Práce je klasicky členěná. Literární přehled je skutečně přehledný, uvádí čtenáře postupně do problematiky, netrpí rozvlácností, ale zároveň neopomíná skutečnosti nezbytné k pochopení studované problematiky. Z textu je patrná autorčina formulační obratnost, se kterou je schopna srozumitelně popsat a vysvětlit i komplikované procesy probíhající v mitochondriích. Text je vhodně doplněn atraktivními obrázky. Narazil jsem na několik překlepů, které jsou však tak nemnohé, že práci nehyzdí. Z obsahového hlediska mám jen několik připomínek. Na straně 8 autorka píše o přesunu mitochondriálních genů do jaderného genomu v průběhu ontogeneze, má asi na mysli fylogenezi. V kapitole o superkomplexech by stál za zmínku komplex, který je složena ze tří částí, komplexu mitochondriální ATP synthasy a dvou přenašečových proteinů, adenin nukleotidového translokátoru a přenašeče anorganického fosfátu. Zatímco představa o existenci superkomplexů složených z některých komplexů elektron transportního řetězce se pomalu stává součástí vysokoškolských učebnic, poznatky o interakcích mezi složkami fosforylačního aparátu jsou poměrně kusé. Práce je vybavena rozsáhlým seznamem zkratk, nenašel jsem v něm však vysvětlení zkratky mPTP,

kteřá se vyskytuje na straně 18. Na straně 21 je podle mého názoru zavádějící věta „v důsledku nízkého využití pyruvátu vzroste hladina laktátu v krvi a moči“. Má autorka na mysli využití pyruvátu v aerobním metabolismu?

Také metodická část, je přehledně sepsána, na jedné straně popisuje použité metody tak, aby bylo možné je případně opakovat, na straně druhé však nezabíhá do zbytečných a zavádějících podrobností. Snad jedinou výtku bych měl k pouze letmé zmínce o permeabilizaci buněk digitoninem. Tento postup je klíčový pro měření respirace fibroblastů a podle mého názoru by si v metodické části zasloužil větší pozornost.

Výsledková část nabízí přehledný souhrn výsledků, které Bc. Michaela Marková získala v průběhu svého magisterského studia a na první pohled je zřejmé kolik času a úsilí musela do experimentální činnosti vložit. Prezentované obrázky se vyznačují dobrou grafickou kulturou, jednotlivé podkapitoly na sebe logicky navazují a čtenář rychle získá představu jak o získaných experimentálních datech, tak o souvislostech mezi jednotlivými etapami výzkumné práce. Mám drobnou připomínku, tzv. poměrové grafy nemají popis osy y a není nutné, aby hodnoty poměrů mezi respiračními jednotlivých komplexů měly škálu na tři desetinná místa. Nebylo mi také jasné, proč autorka u pacientů s HD výsledky respirační zprůměrovala, zatímco u ostatních skupin porovnává pacienty zvlášť. Na obrázku 27 jsem díky jeho nevelkosti toho příliš neviděl.

Kapitola Diskuse potom shrnuje všechny výsledky získané pomocí oxygrafu a dává je do souvislosti i s výsledky získanými pomocí jiných metod.

K předkládané práci mám několik otázek:

1. Podle mého názoru si autorka hned na začátku teoretického úvodu protiřečí, v prvním odstavci píše „V buňce neexistují mitochondrie jako samostatné struktury, ale vytváří velmi dynamické struktury.“ O několik řádek níže se však dočteme „V různých buněčných typech můžeme najít od několika set až po několik tisíc mitochondrií na buňku.“ Jak to tedy je s mitochondriálním retikulem?
2. Zaujal mě nález poměrně nízkého indexu respirační kontroly u měřených fibroblastů (cca 2 -3). Je to u těchto buněk běžné? Na straně 26 na ilustrativním obrázku vidíme IRK nejméně 5.
3. V diskusi jsem postrádal podrobnější zamyšlení nad vlivem přítomnosti galaktózy v médiu na metabolismus fibroblastů. Jak je galaktóza ve fibroblastech metabolizována a proč v médiu s ní některé buňky neprosperují?

Na závěr mohu shrnout, že podle mého názoru představuje předložený opus hodnotnou diplomovou práci, která svědčí jak o píli autorky, tak o jejích schopnostech pracovat ve vědecko-klinické laboratoři. Bc. Michaela Marková získala celou řadu cenných poznatků, které posunují výzkum mitochondrií o kousek dál.

Předkládaná práce podle mého názoru splňuje všechny požadavky kladené na práci diplomovou a doporučuji ji proto jako takovou přijmout.

V Praze 5. června 2015

Doc. RNDr. Martin Kalous, CSc.