

Posudek oponenta diplomové práce

Jméno a příjmení uchazeče : Jan Blecha

Název práce: Vliv proliferace endotheliálních buněk na jejich citlivost k mitochondriálně řízené apoptóze a oxidačnímu stresu

A. Bodové hodnocení jednotlivých aspektů práce (označte právě jednu z možností)

| 1. Rozsah DP a její členění | |
|-------------------------------------|---|
| <input checked="" type="checkbox"/> | A - přiměřené, odpovídají charakteru DP a významu jednotlivých částí |
| <input type="checkbox"/> | B - nevyrovnané, členění není logické n. rozsah jednotlivých částí nekoresponduje s jejich významem |
| <input type="checkbox"/> | C - uspokojivé, rozsah některých částí nedostačuje |
| <input type="checkbox"/> | N - nedostatečné |

| 2. Odborná správnost | |
|-------------------------------------|---|
| <input checked="" type="checkbox"/> | A - výborná, bez závažnějších připomínek |
| <input type="checkbox"/> | B - velmi dobrá, s ojedinělými drobnými závadami (nejasnost výkladu, chyby ve vzorcích nebo chemických názvech, nedokonalý popis metod nebo výsledků) |
| <input type="checkbox"/> | C - uspokojivá, s četnějšími drobnými závadami |
| <input type="checkbox"/> | N - nevyhovující, s hrubými chybami |

| 3. Uvedení použitých literárních a j. zdrojů | |
|--|---|
| <input type="checkbox"/> | A - bez připomínek, všechny převzaté údaje s citací zdroje, celkový počet citací odpovídá charakteru práce |
| <input checked="" type="checkbox"/> | B - uspokojivé, s občasnými neobratnostmi zejm. v umístění odkazů, nebo s celkově nižším počtem citací |
| <input type="checkbox"/> | C - s vážnějšími závadami, např. převažují "nestandardní" odkazy na učebnice, přednášky, webové stránky, nebo se ojediněle vyskytuje opominutí odkazu na zdroj převzatých dat |
| <input type="checkbox"/> | N - nevyhovující, velmi málo citací, ev. rysy plagiátu (časté opomíjení odkazu na zdroj převzatých dat, popř. opsání velkých částí textu) |

| 4. Jazyk práce | |
|-------------------------------------|---|
| <input checked="" type="checkbox"/> | A - výborný, práce je napsána čtivě a srozumitelně, bez závažnějších gramatických n. pravopisných chyb |
| <input type="checkbox"/> | B - velmi dobrý, ojedinělé stylistické neobratnosti, gramatické n. pravopisné chyby |
| <input type="checkbox"/> | C - uspokojivý, četnější slohové neobratnosti, gramatické n. pravopisné chyby, ojediněle se vyskytují obtížně srozumitelné n. nejednoznačné formulace |
| <input type="checkbox"/> | N - nevyhovující, s četnými hrubými chybami |

| 5. Formální a grafická úroveň práce | |
|-------------------------------------|--|
| <input checked="" type="checkbox"/> | A - výborná, bez překlepů a chyb ve formátování |
| <input type="checkbox"/> | B - velmi dobrá, ojedinělé chyby formátu citací, překlepy, chybějící zkratky apod. |
| <input type="checkbox"/> | C - uspokojivá, s ojedinělými většími (např. vynechání stránky) nebo četnějšími drobnými chybami |
| <input type="checkbox"/> | N - nevyhovující, s četnými hrubými chybami |

Případný slovní komentář k bodům 1. až 5. : Předložená diplomová práce je svým rozsahem použitých metod a výsledků kvalitní. Formálně je zpracována na úrovni. Výhrady bych měla k nižší kvalitě obrázků, zejména převzatých obrázků v části literárního přehledu. Kapitola použitých zkratk zahrnuje příliš mnoho zkratk, některé ani nejsou systematicky využity v textu, tedy jsou nadbytečné. Taktéž zkratka pro reaktivní formy oxidu dusíku je zde uvedena RNOS, ale běžně se užívá spíše RNS. Dále v úvodní, nejrozsáhlejší kapitole, chybí citace k mnoha uvedeným skutečnostem. Rozumím, že autor nechtěl práci příliš rozšiřovat, práce již obsahuje 165 citací, ale svým rozsahem si to úvod vyžaduje. Práce je psána čtivě, dobrou češtinou, obsahuje však řadu odborných nepřesností, zřejmě daných velkým rozsahem práce a relativní nezkušeností autora. Výhrady bych měla k nejednotě českého překladu anglických slov obsahujících s/z v češtině (např. tyroZinová kinaSa/str. 10, riboZomy, ATP synthaSa atd.). Po odborné stránce jde o velice zajímavé téma, které má i širší medicínský aspekt. Cíle práce jsou logicky vytyčeny a následně systematicky plněny. Je nutno ocenit, že autor se seznámil s celou řadou metod, které použil při řešení zadaného tématu. Množství vygenerovaných dat by si zasloužilo statistické vyhodnocení, neboť mnohdy nebylo zcela jasné, zda udávané rozdíly hodnot jsou skutečně signifikantní. Následná diskuse je psána věcně.

B. Obhajoba

Dotazy k obhajobě

1. Pro kultivaci buněk, jak standardních, tak $\rho 0$ buněk byla použita odlišná média. Rozličný obsah některých složek (např. glutamin, pyruvát atd.) by mohl zásadně ovlivnit bioenergetiku mitochondrií a tím i tvorbu ROS. Můžete vysvětlit, proč jste zvolil právě tato dvě média?
2. ROS kvantifikace je zde prováděna pomocí dichlorofluoresceinu (DCF). Protože nejde o ratiometrickou пробу, je zcela klíčové pracovat se stejným množstvím buněk. Byly buňky před barvením počítány? I tak by bylo vhodnější v případě kvantifikace takovými próbami zaznamenávat produkci ROS v čase, než jednu hodnotu. Navíc jsem postrádala data o endogenní koncentraci ROS v buňkách (konfluentních, proliferujících i $\rho 0$ variantách), tak i o množství mitochondrií. Máte tuto informaci? Ještě musím podotknout, že Vámi použitá próba je velmi nespecifická k typu ROS, tedy by bylo vhodnější v případě vyjádření mitochondriálních a cytosolických ROS použít jiné, vhodnější próby jako MitoSOX, Hyper atd.
3. Mitochondriální respirace, od které se odvíjí produkce superoxidu, je zde vyjádřena u izolovaných mitochondrií a permeabilizovaných buněk. V obou případech je nutno dodat substráty pro respirační řetězec, tedy je narušena jejich endogenní hladina a tím i produkce superoxidu. Proto takováto respirace nevystihuje přirozené *in situ* podmínky a nelze z ní odvodit možnou produkci superoxidu. Máte údaje o respiraci intaktních buněk, popř. jejich bioenergetické pseudostavy?
4. Mitochondriální tvorba superoxidu je, jak správně uvádíte, odstraňována především enzymem kódovaným SOD2. Jeho proteinová exprese však nekoreluje s naměřenými ROS. Jelikož cytosolické ROS jsou kvantifikovány pomocí DCF próby, nelze říci, jaká část odpovídá mitochondriální produkci. Stejně tak proteinová exprese SOD2 nemusí korelovat s aktivitou. Proto kvantifikace systému/ů pro rozklad peroxidu vodíku je zde vhodnější. V práci kvantifikujete GSH, tedy redukovanou formu glutathionu. Nebylo by vhodnější uvést poměr GSH/GSSG, který by spíše vypovídal o redoxním prostředí?
5. V závěru uvádíte, že „byla provedena řada dílčích experimentů, které zcela neobjasnily otázku vlivu proliferace na citlivost buněk k mitochondriálně řízené apoptóze a oxidačnímu stresu a je třeba provést další experimenty“. Můžete stručně nastínit pokračování projektu?

Stanovisko k opravě chyb v práci:

opravný lístek/oprava v textu **NENÍ** (zakroužkujte) podmínkou přijetí práce

C. Celkový návrh

Navrhovaná celková klasifikace: **výborně**

Datum vypracování posudku: 19.5.2014

Jméno a příjmení, podpis oponenta (SIS): Lydie Plecítá
Fyziologický ústav AV ČR v.v.i.

Lydie Plecítá