

Oponentský posudok diplomovej práce

Názov práce: **Testování vlivu těžkých kovů na buněčnou respiraci**

Autor diplomovej práce: **Bc. Petra Blažková**

Oponent: **RNDr. Zuzana Sumbalová, PhD.**

Predkladaná diplomová práca bola vypracovaná na Univerzite Pardubice, Fakulte chemicko-technologickkej, katedre biologických a biochemických vied pod odborným vedením doc. RNDr. Tomáša Roušara PhD. Práca študuje účinok kadmia na funkciu mitochondrií. V pokusoch sa využívajú izolované mononukleárne bunky, viaceré bunkové kultúry a izolované mitochondrie z bunkových kultúr. Vysoká aktuálnosť diplomovej práce spočíva v zameraní sa na mechanizmus účinku ťažkých kovov, ktoré sú významnou súčasťou odpadových produktov v priemysle.

Diplomová práca má 86 strán a obsahuje 160 citácií, zahraničných aj domácich, vrátane elektronických zdrojov, z toho 42 citácií je z posledných 5 rokov. Text diplomovej práce je zrozumiteľný, je logicky a systematicky členený do jednotlivých kapitol.

V teoretickej časti študentka popisuje pôvod a štruktúru mitochondrie, podrobne rozoberá funkciu respiračného reťazca a mechanizmus pôsobenia inhibítorov a rozpojovačov. Ďalej popisuje variabilitu biologického materiálu používaného v respirometrii od buniek cez homogenáty tkanív až po mitochondrie a podáva zaujímavý prehľad o bunkových líniách a ich využití vo výskume s použitím respirometrie. V závere teoretickej časti sa autorka venuje toxicite kadmia, vymenúva jeho zdroje a rozoberá mechanizmy pôsobenia na úrovni bunky, mitochondrie a komplexov respiračného reťazca.

Ciele práce sú definované jasne a ambiciózne, zahŕňajú zavedenie metódy izolácie mononukleárnych buniek z ľudskej krvi, metódy izolácie mitochondrií z bunkových kultúr a využitie získaného materiálu na testovanie toxicity kadmia pomocou respirometrie.

V časti metódy sú prehľadne popísané použité prístroje, chemikálie a metódy od prípravy roztokov cez izoláciu mononukleárnych buniek z periférnej krvi, izoláciu mitochondrií z bunkových línií po vysokorozlišovaciu respiometriu a protokoly pre meranie respirácie v mitochondriách, permeabilizovaných a intaktných bunkách. Opísaná je aj metóda ovplyvnenia buniek a mitochondrií kadmikom a metóda vyhodnocovania viability buniek.

V časti výsledky autorka prehľadne popisuje získané výsledky, ktoré vhodne dokladá tabuľkami, záznamami z merania respirácie a grafickým vyhodnotením.

V diskusii autorka kriticky hodnotí vlastné výsledky a porovnáva ich so zisteniami iných autorov. V závere uvádza hlavné výsledky práce: pokles respirácie Jurkat buniek po 2- a 4-hodinovej inkubácii a pokles viability buniek po 4-hodinovej inkubácii so $100 \mu\text{M CdCl}_2$.

K diplomovej práci mám nasledovné drobné pripomienky:

- Autorka používa pojmy vysokoúčinná aj vysokorozlišovacia respirometria, správnym prekladom anglického „High-resolution respirometry“ je vysokorozlišovacia respirometria.
- Keďže existuje veľké množstvo formulácií RPMI a DPBS, bolo by vhodné uviesť aj ich katalógové čísla.
- K metóde izolácie mitochondrií z bunkových kultúr by bolo dobré uviesť citáciu.
- V popise tabuľky 8 by bolo vhodné uviesť vysvetlenie, že celkové množstvo buniek získané pri premývaní a v konečnej frakcii PBMC bolo vzťahnuté na pôvodný objem plnej krvi, z ktorej bola frakcia PBMC izolovaná.

Metodické pripomienky:

- Centrifugácia pri rýchlosti $10\,000\text{ g}$ môže spôsobiť porušenie vonkajšej mitochondriálnej membrány. Takéto poškodenie sa prejaví významným zvýšením respirácie po pridaní cytochrómu *c*, ako je to možné vidieť na Grafe 8.
- Rotenon použitý pri meraní uvedenom v grafe 7 a 8 je pravdepodobne kontaminovaný antimycínom A, kdeže po pridaní tohto inhibítora komplexu I je zainhibovaná aj respirácia cez komplex II. Táto experimentálna chyba v danom prípade nebráni správnej interpretácii výsledkov.

K práci mám nasledujúce otázky:

- 1) Sú v tabuľke 11 v čase 0 a 30 min uvedené hodnoty pre Jurkat bunky? Hodnoty sú rovnaké ako v tabuľke 10 pre bunky A549.
- 2) Ako si vysvetľujete rozdielne výsledky získané na intaktných a permeabilizovaných bunkách? Teda ako by ste vysvetlili, že mitochondriálna respirácia v permeabilizovaných bunkách nebola ovplyvnená 2-hodinovou inkubáciou so $100 \mu\text{M CdCl}_2$ a pritom respirácia intaktných buniek bola po 2 h znížená o 34% ?

Záver: Konštatujem, že diplomantka výborne zvládla veľmi náročné zadanie, preukázala schopnosť zvolenú tému teoreticky aj experimentálne spracovať na požadovanej úrovni, použila náročné metodické postupy. Práca splnila vytýčený cieľ, je správne interpretovaná, obsahuje všetky náležitosti a po stránke obsahovej aj formálnej má veľmi dobrú úroveň.

Diplomovú prácu **odporúčam** k obhajobe a hodnotím ju známkou výborne „A“.

V Bratislave 21. 5. 2019



RNDr. Zuzana Sumbalová, PhD.