

Oponent: doc. MUDr. Otto Kučera, Ph.D.

Oponentský posudek na diplomovou práci: „*Vliv hladiny glukózy na energetický metabolismus jaterních buněk*“ autorky Bc. Veroniky Špalkové. Vedoucí diplomové práce byla Mgr. Pavla Žáková, Ph.D. odborným konzultantem dr. Moustafa Elkalaf, Ph.D.

Diplomová práce Bc. Veroniky Špalkové byla vypracovaná na téma vlivu hladiny glukózy v kultivačním médiu na mitochondriální bioenergetiku a buněčnou aktivitu HepG2 buněk.

Diplomová práce má rozsah 138 stran, je doplněna 18 obrázky, 7 grafy a dalšími 18 tabulkami a grafy v příloze. Je dokladována 109 citacemi ze zahraničních i domácích odborných časopisů a knih a několika webových stránek. Práce je členěna na část teoretickou, výsledky a diskusi. V teoretickém úvodu autorka pojednává na 41 stranách o mitochondriích a jejich metabolismu, mitochondriálním bioenergetickém profilu, některých mitochondriálních analýzách, glukózovém metabolismu a HepG2 buněčných liniích. V praktické části Bc. Špalková na 15 stranách pojednává o přípravě kultivačních médií, kultivaci HepG2 buněčných linií, statistických hodnoceních a v práci použitých analýzách. Výsledková část je uvedena na 16 stranách, kde autorka v 7 grafech dokumentuje získané výsledky. Diskusi pak Bc. Veronika Špalková shrnuje metodiku a výsledky své práce, které porovnává a dává do souvislostí s výsledky jiných prací. Citace splňují citační normy.

Přestože je diplomová práce na velice zajímavé téma, v práci nacházím řadu nepřesností a chyb. Je vidět, že práce byla dokončena ve spěchu a neprošla řádnou jazykovou, ani odbornou korekturou. Autorka vytvořila zbytečně dlouhý a podrobný teoretický úvod, díky čemuž pravděpodobně již nezbyl čas na kontrolu celé práce. Autorka při získávání informací ze zahraniční literatury přebírala i anglickou gramatiku a slovosled, často byla slova či celé věty nevhodně přeloženy, v textu se objevují věty bez slovesa a jsou přítomny i překlady. Přesto je vidět, že autorka odvedla obrovský kus práce v laboratoři. V předloženém díle se mi velmi líbí schéma na straně 63, které přehledně vysvětluje pracovní postup.

K práci mám následující připomínky a dotazy:

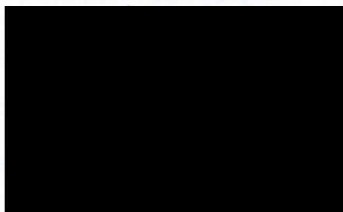
1. Ve zkratkách bych neuváděl vzorce (O_2 , CO_2 , H_2O), zkratka pro elektron je „e⁻“, nikoli „E“.

2. V práci na str. 21 uvádíte o vnitřní mitochondriální membráně: „Permeabilní je pouze pro menší typy molekul, jako je voda, kyslík a CO₂ (oxid uhličitý), pohybující se hmotností od 100 kDa do 150 kDa.“ Uveďte správný rozsah molekulových hmotností.
3. V práci na str. 26 uvádíte, že výsledným produktem citrátového cyklu je jedna molekula energie. Upřesněte, co tím myslíte.
4. V textu na straně 28 rozebíráte dýchací řetězec, přičemž komplex I nazýváte dehydrogenázou. Můžete upřesnit název komplexu I?
5. Na straně 29 píšete, že komplex IV přenáší protony do mitochondriální matrix, nicméně na obrázku 4 je přenos opačným směrem. Vysvětlete, který směr přenosu je správný a z jakého důvodu by neměl být opačný.
6. Na straně 30 uvádíte: „Tímto procesem vzniká v mezimembránovém mitochondriálním prostoru protonový gradient, který svou energií umožňuje zahájení syntézy ATP. Během reakce dochází také k redukci kyslíku za vzniku vody.“ Jakou reakci máte namysli?
7. V metodické části by bylo vhodné blíže specifikovat použité chemikálie, roztoky, média a přístroje (výrobce, přesný název, ev. kat. číslo). Např. straně 42 píšete, že Tecan-I-control slouží k analýze WST-1 assay. Ve skutečnosti jde o přístroj Tecan Infinite 200 a ovládací software I-control.
8. Cíle práce by měly být uvedeny dříve než v závěru („Cílem bylo zjistit, jakým způsobem se liší buněčná viabilita, mitochondriální aktivita a bioenergetický profil HepG2 buněk v závislosti na typu použitého kultivačního média.“).
9. V práci opakovaně uvádíte, že WST-1 assay byla použita ke stanovení viability. Vysvětlete, jak je obvykle viabilita buněk *in vitro* definována a jak je hodnocena. Pro upřesnění uvádím, že WST-1 assay odráží celkovou metabolickou aktivitu buněk (aktivitu buněčných dehydrogenáz), díky čemuž je velmi ovlivněna počtem metabolicky aktivních buněk.
10. Na straně 44 uvádíte: „Nasazení buněk je nejlepší provádět při konfluenci 60 až 90 %.“ Nejde spíše o dobu, kdy je třeba provést pasážování, nebo o vhodnou konfluenci pro měření?
11. Co myslíte tvrzením, že „Štěpení glykogenu je možné i v kosterním svalstvu. Zde je bohužel tento proces méně efektivní.“
12. V práci uvádíte koncentraci glukózy v g/l, nicméně v klinice se obvykle uvádí v mmol/l. Rovněž porovnáváte Vámi použité koncentrace glukózy s jinými

- pracemi, které však hodnoty vyjadřují v mmol/l. Převed'te používané hodnoty z g/l na mmol/l a dejte je do souvislostí s klinickými nálezy u zdravých lidí a diabetiků.
13. Na straně 48 uvádíte, že „Většina metabolických nemocí a komplikace s nimi spojenými, vznikají na podkladě hyperglykémie a zvýšené koncentrace nenasycených mastných kyselin.“ Jde skutečně o nenasycené mastné kyseliny?
 14. Do pojednání o metabolismu glukózy na str. 49 je zcela nelogicky a bez vysvětlení včleněn odstavec o triacylglycerolech. Na další straně pak píšete „Glykolýza je základním metabolickým dějem, při kterém dochází k syntéze **triacylglycerolů** a **ATP**.“ S tímto nelze rozhodně souhlasit, proto své tvrzení opravte a blíže vysvětlete. Současně s tím vysvětlete text o glykolýze ze str. 51: „Až na základě aktuálních možnostech organismu se rozhodne, zda bude probíhat **reakce katabolická** (syntéza ATP) či **reakce anabolická** (syntéza acetyl-CoA a následný vznik triacylglycerolů)“.
 15. V práci píšete na str. 50, že „V jaterních buňkách se uplatňuje účinek glukokinázy.“, nicméně na str. 51 uvádíte, že „Tuto reakci katalyzuje v jaterních buňkách enzym hexokináza“. Který enzym se tedy uplatňuje při fosforylaci glukózy v hepatocytech v prvním kroku glykolýzy?
 16. Na straně 70 píšete bez dalšího vysvětlení, že: „Co se týče nároku na živiny, tak hyperglykemické HepG2 buňky byly na spotřebu živin náročnější. Živiny obsažené v médiu spotřebovaly rychleji, nežli normoglykemické HepG2 buňky.“ Byly živiny v kultivačních médiích po inkubaci měřeny? Pokud ne, vysvětlete, jak jste k tomuto závěru došla.
 17. Ve statistické analýze píšete, že byla použita jednosměrná ANOVA. Byla předtím testována normalita dat? A rovněž upřesněte, jaký post hoc test jste použila.
 18. Na straně 75 uvádíte „FCCP umožňuje navýšení protonového gradientu, což podmiňuje maximální respirační rychlost.“ Opravte, jak FCCP ovlivňuje protonový gradient.
 19. V textu uvádíte, že detekce u WST-1 testu byla při vlnové délce 440 nm, nicméně pod grafy uvádíte vlnovou délku 450 nm. Která vlnová délka byla ve skutečnosti použita?
 20. Na straně 97 vztah hyperglykémie a onkogeneze, nicméně chybí citace. Mohla byste 2-3 citace uvést?

Přes uvedené připomínky a komentáře konstatuji, že diplomová práce Bc. Veroniky Špalkové splňuje cíle uvedené v závěru diplomové práce, a proto ji doporučuji k obhajobě a hodnotím ji:

C



V Hradci Králové 19. 5. 2023

doc. MUDr. Otto Kučera, Ph.D.