

Oponentský posudek diplomové práce:

DETEKCE FRAGMENTŮ DNA PŘI POŠKOZENÍ BUNĚK

Autor: **Bc. Věra Brychtová**
Vedoucí diplomové práce: doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D.
Konzultant diplomové práce: Mgr. Jan Čapek

Diplomová práce Bc. Věry Brychtové se zabývá problematikou metod využívaných pro detekci apoptózy. Konkrétně je práce zaměřena na optimalizaci a zavedení metody TUNEL včetně jejího praktického uplatnění při *in vitro* testování indukce apoptózy na lidské renální proximální tubulární buněčné linii HK-2.

Cílem předložené diplomové práce byla optimalizace a zavedení metody TUNEL využívané pro detekci fragmentů DNA a s tím související detekci apoptózy. Úvodní teoretická část je jakýmsi vhladem do problematiky apoptózy, včetně způsobů její aktivace a porovnání s nekrózou. Dále se práce zabývá problematikou DNA zlomů a metodami využívanými pro detekci morfologických a zejména pak biochemických znaků apoptózy, kam patří cílová metoda TUNEL, ale také metody ISEL, stanovení mitochondriálního membránového potenciálu či stanovení aktivity kaspáz. Shrnutí metod je zpracováno stručně, výstižně a přehledně. Experimentální část práce zahrnující optimalizaci jednotlivých kroků metody TUNEL je rozpracována do dílčích podkapitol, které velmi vhodně přispívají k přehlednosti celé práce. Z vlastního postupu optimalizace je patrné, že zavedení metody nebylo jednoduchou rutinní záležitostí. Toto usuzuji z počtu proměnných, které byly v rámci optimalizace dílčích kroků metody TUNEL testovány, a mohly tedy ovlivnit výsledek celé metody.

Předložená diplomová práce má rozsah 77 stran, přičemž teoretické informace jsou podloženy 89 citacemi publikovanými převážně v zahraničních odborných časopisech. Praktická část diplomové práce je vhodně doplněna o fotografie z fluorescenčního mikroskopu, které dokumentují dílčí kroky v procesu optimalizace postupu metody TUNEL. Po formální a jazykové stránce má práce velmi dobrou úroveň, její uspořádání je přehledné. Jedinou připomínkou k formální úpravě diplomové práce je opakovaný výskyt předložek a spojek na konci řádků. Po praktické a odborné stránce je práce velmi zdařilá, zejména bych

chtěl vyzdvihnout vlastní diskusi výsledků, která je psána velmi výstižně, neodbíhá od tématu a je přiměřeného rozsahu.

Otázky do diskuse pro autora:

1. V diplomové práci zmiňujete, že metoda TUNEL je nejhojněji využívanou metodou pro detekci apoptózy. Převažuje v publikacích využití vlastních optimalizací částečně modifikovaných metod TUNEL, nebo je více využívána komerčně dostupná TUNEL assay?
2. Použili jste při zavádění metody TUNEL ještě jinou metodu pro detekci apoptózy, se kterou byste porovnali výsledky zaváděné metody?
3. Co bylo kritériem pro volbu toxinů používaných při ovlivnění HK-2 buněk?
4. Z jakého důvodu je podle Vás komerční metoda TUNEL citlivější, než Vámi zavedená metoda?

Oponovaná diplomová práce splňuje vytyčené cíle uvedené v zadání, v teoretické části přehledně zpracovává problematiku apoptózy a metod určených pro detekci apoptózy, v praktické pak celkově optimalizuje zavedení metody TUNEL a porovnává ji s komerční metodou TUNEL. Práce je kvalitním dílem s přesahem do oborů buněčné biologie, genetiky, instrumentální analytické chemie a částečně také toxikologie. Na tomto základě tedy diplomovou práci Bc. Věry Brychtové **doporučuji k obhajobě.**

Příloženou práci hodnotím známkou: **A**

V Pardubicích dne 24. 5. 2018



Mgr. Jiří Handl