

OPONENTSKÝ POSUDEK DIPLOMOVÉ PRÁCE

Název diplomové práce: **Změny metabolismu buněk po působení modelových toxických látek**

Autor diplomové práce: **Bc. Barbora Tošovská**

Vedoucí diplomové práce: **doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D.**

Konzultant: **Mgr. Jan Čapek, Ph.D.**

Oponent: **Mgr. Lenka Brůčková, Ph.D.**

Diplomová práce se zabývala stanovením pulmo- a neurocytotoxicity vyvolanými modelovými látkami pomocí bioanalytických metod, mikroskopie a exprese HSP (proteinů tepelného šoku). V teoretické části diplomantka popsala strukturu a úlohu mitochondrií v organismu se zaměřením na jednotlivé komplexy dýchacího řetězce, syntézu ATP a metody jeho detekce. Na konci této části se autorka zaměřila na metody detekce HSP v souvislosti s buněčnou apoptózou.

V experimentální části diplomantka popsala zavedení luminiscenční metody k detekci koncentrace ATP a její využití u modelových toxických látek (cisplatiny, CdCl_2 , acetaminofenu a strausosporinu). Stanovení cytotoxicity bylo doplněno WST-1 testem, stanovením hladiny glutathionu, fluorescenční mikroskopii a stanovením hladin HSP metodou Simple Western.

Na straně 69 je uvedeno, že vybraná modelová látka CdCl_2 vyvolává oxidační stres, což způsobuje snížení koncentrace ATP. Z grafu 1B lze vidět, že u buněk A549 inkubovaných s 25 μM CdCl_2 došlo k mírnému zvýšení ATP v obou časech. Navíc u vyšší 100 μM koncentrace CdCl_2 byl stanoven dokonce čtyřnásobný nárůst koncentrace ATP za 24 hod. Jak si to vysvětlujete?

V kapitolách 3.4 a 3.5 je uveden postup kultivace buněk obecně. V kap. 3.6 je uveden počet buněk, který byl nasazen do 96-j destičky pro všechny bioanalytické metody společně. Jeden z cílů práce bylo optimalizovat přípravu biologického materiálu pro detekci koncentrace ATP v buňkách, tato kapitola mi tu chybí. Mohla byste tedy objasnit jednotlivé kroky optimalizace?

U všech bioanalytických metod je uveden čas měření. Tento údaj chybí u stanovení koncentrace glutathionu. V jakém čase probíhalo měření MCB?

Na obr. 13 je zachycena linie SH-SY5Y po ošetření toxickou látkou CdCl_2 (25 μM), jak je zde uvedeno, došlo ke zvýšení počtu buněk. Je toto tvrzení podepřeno nějakou analýzou obrazu nebo stanovením počtu buněk po trypsinizaci? Jak byste v této souvislosti vysvětlila zvýšenou dehydrogenázovou aktivitu buněk SH-SY5Y v grafu 3A. Způsobuje tedy 25 μM CdCl_2 proliferaci buněk nebo zvyšuje jejich metabolickou aktivitu?

Rozsahově bych práci hodnotila jako dostačující, bez úvodních stran a seznamu literatury má 63 stran, velmi pozitivně hodnotím i množství literatury, které k sepsání práce autorka použila (133 zdrojů). Práce je sepsaná velmi pečlivě. Diplomantka splnila zadání a předložila kvalitně zpracovanou práci. S ohledem na celkové zpracování diplomové práce ji **doporučuji k obhajobě a mé závěrečné hodnocení je: A**

V Pardubicích dne 27. 5. 2022

Mgr. Lenka Brůčková, Ph.D.
oponent práce