



Galina Černá  
KBBV  
Univerzita Pardubice  
Studentská 573  
532 10 Pardubice

V Hradci Králové, dne 16. května 2012

## **Oponentský posudek diplomové práce**

**Autor práce:** Bc. Lenka Hromádková, Fakulta Chemicko-technologická, Univerzita Pardubice  
**Název práce:** Vliv separačních podmínek na funkční vlastnosti granulocytů izolovaných z periferní krve.  
**Oponent:** PharmDr. Aleš Tichý, Ph.D.

Předkládaná diplomová práce studentky oboru Analýzy biologických materiálů, **Bc. Lenka Hromádková**, má celkem 102 stran. V rozsáhlém (36 stran) a velmi dobře zpracovaném literárním úvodu autorka popsala obecně neutrofilní granulocyty a jejich obranné mechanismy závislé a nezávislé na kyslíku. V souladu se zadáním diplomové práce se pak soustředila na reaktivní sloučeniny kyslíku a dusíku, NADPH-oxidázu a myeloperoxidázu. Dále byla zahrnuta kapitola týkající se instrumentace a principu průtokové cytometrie a jejího využití při studiu funkce neutrofilů, což považuji za velmi vhodné, jelikož práce se stává čtivou a srozumitelnou i pro čtenáře, který nemá praktické zkušenosti s touto technikou. Literární úvod je doplněn devíti aktuálními schématy. Chybí sice explicitně stanovené cíle práce, ale čtenář je může nalézt v souhrnu; tedy 1) optimalizovat metodu třídění granulocytů periferní krve na průtokovém tříděči s ohledem na následnou analýzu fagocytární aktivity měřenou jako míru oxidativního vzplanutí po stimulaci buněčnou suspenzí inaktivovaných bakterií E. coli a 2) analyzovat míru apoptózy.

Experimenty byly provedeny na vzorcích lidské krve 3 dárců a výsledky jsou bohatě popsány na 24 stranách, přičemž u každé části je stručný závěr. Z výsledků vyplývá, že lýza červených krvinek pomocí EasyLyse kitu ani hypotonická lýza ledovou deionizovanou vodou nejsou vhodné metody pro přípravu vzorků krve k sortování granulocytů s následným testováním jejich funkčnosti. Jako optimální metoda byla zvolena sedimentace periferní krve v inzulínových stříkačkách, což je metoda levná, snadno proveditelná a nedochází během ní k poškození granulocytů. Významným zjištěním práce je, že optimální parametr průtokového měřiče, tzv. nozzle, je průměr 70  $\mu\text{m}$ . Při porovnání s průměry 85 a 100  $\mu\text{m}$  autorka uvádí, že byly zjištěny významné rozdíly středních hodnot



fluorescence (MFI) granulocytární populace v závislosti na použitém vzorku, ovšem v práci není uvedeno, zda a jakým způsobem byla získaná data statisticky zpracována, proto je potřeba se podobných tvrzení vyvarovat anebo data adekvátně zpracovat. Dále bylo prokázáno, že během aplikované metody se nesnížila viabilita buněk u žádného dárce (při všech specifikovaných podmínkách s požitím nozzlů 70, 85 a 100  $\mu\text{m}$ ) pod 95 %.

Výsledky práce jsou pak diskutovány na 7 stranách, kde autorka dokazuje dobrou práci s literaturou a je zřejmé správné pochopení použité metody. Za zmínku stojí, že práce obsahuje 186 (!) citací a autorka dodržela požadované citační normy. Práce je sepsána srozumitelnou formou, s minimem překlepů. Pokud se hodlá autorka dále zabývat vědeckou prací, doporučuji do budoucna vyvarovat se používání singuláru („domnívám se, že..“ apod.); vědecká práce je přeci jen práce v týmu pracovníků.

Na předložené práci je ze soudobých citací patrná aktuálnost tématu a závěry budou jistě využity v dalších experimentech. Práce má potenciál být publikována v časopise s „impakt faktorem“.

**Otázky a připomínky recenzenta:**

- 1) Doporučuji dopracovat statistické srovnání mezi jednotlivými skupinami.
- 2) Průtokový třídič buněk pracuje v několika sortovacích módech. Zdůvodněte, jaký sortovací režim jste si vybrala a proč.

**Závěr :**

Práce byla naplánována, provedena a sepsána vědecky odpovídajícím způsobem a přinesla nové poznatky týkající se optimalizace metody třídění granulocytů periferní krve. Byla použita moderní metodika v souladu se současnými světovými trendy. Předložená práce **vyhovuje** všem předpisům stanoveným pro diplomovou práci. Proto ji navrhuji přijmout k obhajobě a vzhledem ke kvalitě předkládané práce ji **hodnotím známkou výborně**.

PharmDr. Aleš Tichý, Ph.D.

Katedra Radiobiologie  
Fakulta Vojenského Zdravotnictví  
500 01 Hradec Králové  
tel.: +420 973 253 216  
e-mail: [tichy@pmfhk.cz](mailto:tichy@pmfhk.cz)