

Oponentský posudek diplomové práce

Název práce: Identifikace biomarkerů imunotoxicity u kroužkoců pro ekotoxikologické testy

Autor práce: Bc. Hana Krykorková

Vedoucí práce: Mgr. Marcela Slováková, Ph.D.

Oponentka: Mgr. Petra Kubincová, Ph.D. (VUOS a.s., Pardubice)

Předložená diplomová práce se zabývá tématem studia potenciálních biomarkerů imunotoxicity roupic, jako zástupce kroužkoců. Práce se zaměřuje na metody sledování imunitních buněk coelomocytů u modelového organismu rousice *Enchytraeus crypticus*, na jejich izolaci, identifikaci a hodnocení. Dále se zaměřuje se na vybrané biomarkery imunotoxicity jako je životaschopnost imunitních buněk a množství riboflavinu, v rámci čehož byly využity metody fluorescenční a optické mikroskopie, spektrofluorimetrie a průtokové cytometrie.

Diplomová práce má rozsah 91 stran, včetně souhrnu literatury a formálních částí. Práce je přehledně členěná do kapitol s obvyklou posloupností - tedy teoretická část, experimentální část, výsledky/diskuze a závěr zakončený seznamem literatury.

Práce je zpracována s využitím 104 literárních zdrojů, které mají povahu odborných vědeckých publikací, doplněna grafy, přehledovými tabulkami a obrázky. Autorka prokázala schopnost práce s odbornou literaturou, i když se zcela nevyhnula mírným nepřesnostem. Např. v překladu pro kapitolu 1.4.1, kde nepřesně překládá rozdělení metod imunotoxicity *in vitro*, které jsou používány v preklinickém testování - jako typ stanovení označuje „stanovení apikálních koncových bodů buněk“, kde originální text zní „apical endpoints such as cell viability and apoptosis“ a jedná se spíše tedy o překlad ve smyslu „nespecifické ukazatele jako je buněčná životaschopnost a apoptóza“. Nebo v Tabulce 2 na str. 32 je termín „culture condition“ přeloženo jako „stav kultury“, ale správně by mělo být „podmínky kultivace buněk“.

V teoretické části autorka začíná tématem ukazatelů toxicity v ekotoxikologii a představuje skupinu kroužkoců, jejich funkci, stavbu těla a zástupce. Dále se zaměřuje na téma imunitního systému jak u kroužkoců, tak u člověka a nakonec popisuje metody testování imunotoxicity používané v preklinické toxikologii a v testech u bezobratlých.

V experimentální části práce je představen modelový organismus *E. crypticus*, podmínky jeho chovu a využití v ekotoxikologickém testu. Dále jednotlivé metodické postupy izolace a identifikace imunitních buněk rousice a jejich optimalizace pro hodnocení životaschopnosti a autofluorescence buněk. V závěrečné části jsou pak popsány a vhodně diskutovány získané výsledky s navržením dalších postupů, kudy by se práce na tomto tématu mohla ubírat.

K diplomové práci mám následující připomínky:

- S ohledem na zaměření diplomové práce bych více v teoretické části rozvedla téma imunotoxicity a biomarkerů imunotoxicity u kroužkoců. Chybí mi tu zejména informace/shrnutí jaké další typy biomarkerů pro imunotoxicitu jsou známy ve vědecké literatuře a proč byly vybrány pro tuto diplomovou práci endpointy životaschopnosti a/nebo množství riboflavinu. Není zde zmíněna a rozvedena ani informace, že existuje i možnost extruze imunitních buněk a následný test *in vitro*, tedy test chemické látky s imunitními buňkami mimo modelový organismus, ani případné rozdíly v použití/hodnocení oproti druhému typu testu *in vivo*, který byl proveden v experimentální části.

- Na str. 49 je vzorec výpočtu koncentrace buněčné suspenze, ale chybí k němu vysvětlivky, co ta čísla znamenají a jaký je jejich význam.
- V cílech práce je zmíněno, že by autorka měla shromáždit na zadané téma také informace o druhu Žížalce (*Lumbriculidae*), avšak v textu diplomové práce informace o těchto kroužkovcích chybí (kromě jediné zmínky na str. 20).

Dotazy:

- 1) Znáte nějakou studii, která se zabývá autofluorescencí riboflavinu v eleocytech u roupic v přirozeném prostředí, např. v reálných znečištěných půdách? Jak může případně ovlivňovat autofluorescenci riboflavinu přítomnost kovů v půdě?
- 2) Jaké další molekuly mohou být v eleocytech kromě riboflavinu autofluorescenční? Existuje nějaká studie, která dokazuje tvrzení, že naměřená autofluorescence coelomocytů - eleocytů pochází z molekuly riboflavinu?
- 3) Byly pro ekotoxikologický test s chloridem nikelnatým využiti jen dospělí jedinci roupice *E. crypticus* nebo stáří jedinců nehrálo v testu roli a byla testována smíšená populace? Mohlo by složení populace modelového organismu v testu ovlivnit naměřené výsledky?

Diplomová práce je pěkně zpracovaná, pravopisně v pořádku, počet překlepů je nízký. Stanovené cíle práce byly dle mého názoru naplněny. Autorka zvládla optimalizaci několika metod, vyzkoušela si různé přístupy analýzy buněčných vzorků a jejich vyhodnocení, včetně měření a vyhodnocení průtokové cytometrie, což je jedna z nejnáročnějších analýz v molekulární biologii. Velmi pozitivně hodnotím zpracované téma, zejména v experimentální části, kde si kromě analýz osvojila i zacházení s modelovým organismem.

Práci doporučuji k obhajobě a klasifikuji známkou B.

V Pardubicích, 18.05.2023


Mgr. Petra Kubincová, Ph.D.