

Oponent: Mgr. Pavla Křiváková, Ph.D.

Oponentský posudek na diplomovou práci: „*Optimalizace podmínek kultivace potkaních hepatocytů in vitro*“ autora Bc. Hany Rajhelové. Vedoucí diplomové práce: Mgr. Tomáš Roušar, Ph.D.

Cílem předložené diplomové práce bylo optimalizování kultivačních podmínek primárních kultur hepatocytů potkana. Testován byl vliv objemu kultivačního média, doby *seedingu* a denzity buněk na viabilitu hepatocytů. Ta byla hodnocena pomocí stanovení aktivity laktátdehydrogenázy (LDH) v kultivačním médiu resp. *LDH-leakage* (poměr aktivity LDH v kultivačním médiu ku součtu aktivit intracelulární a extracelulární aktivity LDH) a pomocí WST-1 testu.

Diplomová práce má rozsah 63 stran, je vhodně doplněna 22 obrázky a grafy a 12 tabulkami. Je dokladována 47 citacemi publikovanými v zahraničních i českých odborných časopisech a rovněž citacemi z internetu. Práce je klasicky členěna, v literárním přehledu autorka na 22 stranách předkládá souhrnné informace o struktuře a funkci jater, o buněčných systémech hepatocytů *in vitro*, metodách hodnocení viability hepatocytů *in vitro* a toxické látky – terciárním butylhydroperoxidu (tBHP). Metodická část je přehledně zpracovaná na 9 stránkách a ukazuje, že autorka je schopna samostatně pracovat s primárními kulturami hepatocytů potkana, měřit aktivitu LDH a hodnotit viabilitu prostřednictvím WST-1 testu. Výsledková část je uvedena na 11 stranách a dobře dokumentuje získaná data. Diskuse a závěr jsou koncisní a shrnují dosažené výsledky.

K práci mám následující připomínky a dotazy:

1. V souhrnu se vyskytuje zkratka tBHP bez předchozího vysvětlení, což snižuje srozumitelnost v textu. Autorce bych doporučila buď zkratku předem vysvětlit, nebo ji v souhrnu nepoužívat.
2. V souhrnu bylo použito pro pojem „přisednutí“ jednak správně slovo *seeding* a jednak slovo *seading*, které v angličtině neexistuje, pravděpodobně jde o překlep. Tento překlep se vyskytuje i v obsahu (3.7.2). V textu jsou i další překlepy (např. na str. 23 v 2.2.2.1 „aktivita surová kolagenázy“) a chyby v interpunkci (např. na str. 19 v 2.1.3.3 v druhé větě: „Jaterní buňky produkují různé lipoproteiny...“).
3. K výsledkům mám následující dotaz. V grafu na str. 48 – obr. 16 je zobrazen vliv objemu kultivačního média na viabilitu hepatocytů, kdy došlo k signifikantnímu zvýšení viability buněk (hodnocené pomocí WST-1 testu) při použití objemu 150

μl oproti 100 μl . Na straně 50 je graf (obr. 18) vlivu objemu média na viabilitu při poškození terciárním butylhydroperoxidem. Na tomto grafu není signifikantní rozdíl mezi kontrolní skupinou inkubovanou v objemu 100 μl oproti 150 μl . Jak si tento rozdíl vysvětlujete?

4. V grafu na straně 51 (obr. 19) hodnotíte vliv objemu média na extracelulární aktivitu LDH při poškození tBHP. Bohužel z textu není zřejmé, zda jste přepočítala aktivitu LDH v objemu 150 μl na aktivitu odpovídající objemu 100 μl . Navíc na grafu na str. 45 (obr. 13) je aktivita LDH u objemu 150 μl vyšší než u objemu 100 μl . Vysvětlete, prosím, tyto rozporuplné výsledky a komentujte postup při měření LDH ze str. 51.
5. V diskusní části na straně 56 je věta: „Protože bylo nadále pracováno pouze s denzitou 30 000 bb/j, byly použité parametry stanovení shledány jako optimální.“ Tato věta by jistě měla znít spíše takto: „Jako optimální byla shledána kultivace s denzitou 30 000 bb/j, proto bylo nadále pracováno ...“
6. V diskuzi by bylo vhodné se odkazovat přímo na čísla grafů z výsledkové části pro snadnější orientaci a kontrolu.
7. Na str. 58 je jako optimální doba WST-1 testu uvedena 1 hodina. Vhodnější by bylo napsat, že tato doba je dostatečná, neboť v textu na str. 56 uvádíte: „Vhodné by tedy bylo inkubovat buňky s WST-1 po dobu 3 hodin, kdy je signál nejvyšší.“

Přes uvedené připomínky konstatuji, že diplomová práce Bc. Hany Rajhelové je zdařilá a splňuje cíle uvedené v zadání, a proto ji doporučuji k obhajobě a hodnotím ji:

Výborně-M

V Hradci Králové 25. 5. 2009


Mgr. Pavla Křiváková, Ph.D.