

Oponent: MUDr. Otto Kučera, Ph.D.

Oponentský posudek na diplomovou práci: „*Optimalizace zpracování jaterní tkáně pro fluorimetrické stanovení glutathionu*“ autorky Bc. Štěpánky Maňáskové. Vedoucí diplomové práce byl RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D.

Cílem předložené diplomové práce bylo optimalizovat preanalytické zpracování biologických vzorků jater potkana pro fluorimetrické stanovení redukovaného glutathionu (GSH). Konkrétně se pak jednalo o sledování vlivu teploty skladování vyjmutých jater, teploty při homogenizaci a druhu homogenizace, teploty skladování homogenátů a druhu deproteinačního činidla na změřenou koncentraci GSH ve vzorku.

Diplomová práce má rozsah 75 stran, je doplněna 9 obrázky, 12 grafy a 16 tabulkami (z nichž je 9 v příloze). Je dokladována 81 citacemi publikovanými v zahraničních i českých odborných časopisech, knihách a na webových stránkách. Práce je klasicky členěna, v literárním přehledu autorka na 23 stranách předkládá souhrnné informace o reaktivních formách kyslíku a dusíku, antioxidačním systému buněk s důrazem na glutathion (struktura, formy, syntéza, funkce a metabolismus) a na možnosti stanovení obsahu glutathionu v biologických vzorcích. Metodická část je přehledně zpracovaná a soustřeďuje se zejména na zpracování vzorku ke stanovení glutathionu a vliv některých podmínek při přípravě vzorku na výslednou koncentraci GSH, jak bylo zadáno v pokynech pro zpracování diplomové práce. Výsledková část je uvedena na 9 stranách a dokumentuje vliv některých faktorů na změřené koncentrace GSH. Diskuse je koncisejší, závěr práce přehledně shrnuje dosažené výsledky a citace splňují citační normy. Práce je přes některé drobné nedostatky po formální a odborné stránce kvalitní.

K práci mám následující připomínky a dotazy:

1. Některé zkratky jsou použity v textu, ale nejsou uvedeny v „Seznamu použitých zkratek“ (UV, GC-MS, MAPEGs).
2. Na str. 22 píšete, že „cystein je syntetizován z methioninu ... za přispění pyridoxinu a vitamínu B6“. Mohla byste toto tvrzení upřesnit?
3. Vysvětlete, prosím, jakým způsobem vede přímá reakce cysteinu s volnými radikály ke vzniku oxidovaného glutathionu (GSSG), jak uvádíte na str. 23- 24?

4. Mohla byste okomentovat ne zcela přesné tvrzení (str. 24) „Konjugaci glutathionu s elektrofilními sloučeninami katalyzuje enzym GST, což má za následek urychlení exkrece toxických látek ledvinami“?
5. Na straně 42 píšete, že „jste vlastní homogenizaci prováděli homogenizačním roztokem, ...“, ale nepíšete, zda byla homogenizace prováděna pístovým či jiným homogenizátorem a za jakých podmínek?
6. Na str. 43 by bylo vhodné doplnit citaci Vašeho školitele, podle které jste dělala fluorimetrické stanovení glutathionu.
7. Vzhledem k rovnici uváděné v grafu 2 na str. 49 jistě nejde o kalibrační přímku, jak píšete.
8. Velice zajímavým výsledkem, který jste zjistila, je zvýšení obsahu GSH ve vzorcích jater po 3 hodinách na ledu oproti stavu po 30 a 60 minutám. Opakovala jste tento pokus vícekrát, resp. neměřila jste i poměr GSH/GSSG ve vzorcích? S tímto dotazem souvisí i tvrzení v diskuzi, které se odkazuje na oxidaci GSH při tepelném šoku při skladování jater na ledu. Myslíte si, že k teplotnímu šoku nedochází při homogenizaci jater, protože zde je, jak jste zjistila, výhodnější homogenizace na ledu oproti pokojové teplotě.
9. Na str. 53 v grafu 7 je u 3. vzorku očividně významný pokles GSH při laboratorní teplotě oproti ledu, nicméně neuvádíte zde, že by byl signifikantní. Opravdu je tento pokles statisticky nevýznamný?
10. Dokázala byste odhadnout, jaký zlomek signálu při fluorimetrickém měření GSH mohou tvořit proteiny v deproteinovaném vzorku?

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

Výborně-M



V Hradci Králové 27. 5. 2013

MUDr. Otto Kučera, Ph.D.