

*Oponentský posudek diplomové práce Bc. Markéty Zelendové „Stanovení aktivity cytochromu P450 2E1 v primárních kulturách hepatocytů“.*

Diplomová práce má čtyři cíle. První dva jsou zaměřené na zvládnutí metodických postupů práce s kulturami myších a potkaních hepatocytů a na přípravu a zpracování vzorků k měření. Další dva cíle tvoří jádro diplomové práce a jejich výsledky jsou v práci přehledně zpracovány. Autorce práce se podařilo všechny cíle úspěšně splnit a rozšířit spektrum metodik pracoviště, kde diplomová práce vznikala, o spektrofotometrické stanovení aktivity cytochromu P450 2E1 s využitím p-nitrofenolu jako substrátu. Metodický postup adekvátně vycházel z přístrojového vybavení a časových možností pracoviště. Autorka práce stanovila optimální koncentrace substrátu a potvrdila jeho možnou toxicitu na myších a potkaních hepatocytech.

Práce je tradičně rozčleněna na část teoretickou, metodickou a výsledkovou. Přitom obsahuje seznam ilustrací, tabulek a zkratk. V teoretické části autorka stručně, avšak dostatečně srozumitelně definuje skupinu cytochromů P450, poukazuje na jejich význam zejména s ohledem na biotransformační procesy v játrech a zaměřuje se na bližší charakteristiku v práci stanovovaného cytochromu P450 2E1. Podává zde přehled metodických postupů pro stanovení aktivity enzymů s důrazem na výše zmíněný CYP2E1 a uvádí příklady modelových systémů pro testování aktivity těchto enzymů. Výsledky jsou přehledné, dobře okomentované, doplněné grafy a fotografiemi kultur buněk. V diskusi autorka komentuje výsledky a vyvozuje z nich přiměřené závěry. V práci se autorka opírá o citace a je třeba vyzdvihnout, že se jedná o aktuální práce především zahraničních autorů.

Formální nedostatky práce jsou zanedbatelné.

K práci mám pouze tato doporučení:

Autorka práce stručně popisuje stavbu jaterní tkáně a pokud zmiňuje morfologickou a funkční jednotku jater, bylo by vhodné i uvést základní rozdíl mezi nimi. Rovněž zde uvádí, že hepatocyty tvoří 60 % jater. Formulace by měla lépe vyjádřit, zda má na mysli 60 % z buněčné populace v játrech apod.

Ve výsledkové části věnované morfologii buněk by mělo být zřetelněji jasné, zda před expozicí testovaným látkám byly hepatocyty inkubovány 2 nebo 24 hod.

Prosím o zodpovězení následujících otázek:

Ve své práci uvádíte příklady systémů pro testování enzymové aktivity, jejich výhody a nevýhody. Mohla byste informaci doplnit i o výhody a nevýhody použití izolovaných mikrosomů a je možno použít také jaterní homogenát?

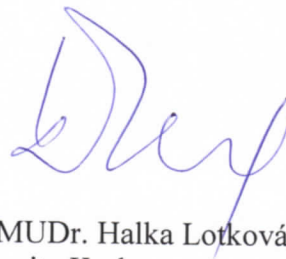
Metodiku stanovení aktivity CYP2E1 jste zaváděla na kultuře typu monolayer. V teoretické části práce zmiňujete 3D kultivační systémy a jejich výhody, můžete uvést příklad takového systému?

Ke stanovení množství proteinů je možno použít více metod. Z jakého důvodu byla zvolena metodika s „Bradford činidlem“ ?

Diplomová práce splnila jednoznačně hlavní cíl – stanovit aktivitu cytochromu P450 2E1 v primárních kulturách hepatocytů.

Předloženou diplomovou práci doporučuji k obhajobě a hodnotím ji známkou

- výborně



Doc. MUDr. Halka Lotková, Ph.D.  
Univerzita Karlova  
Lékařská fakulta v Hradci Králové

V Hradci Králové 29. 5. 2017