

Oponentský posudek diplomové práce:

## STUDIUM NEUROTOXICITY TĚŽKÝCH KOVŮ *IN VITRO*

*Autor:* **Bc. Lenka Tichá**  
*Vedoucí diplomové práce:* RNDr. Jiří Handl, Ph.D.  
*Konzultant diplomové práce:* Mgr. Jan Čapek, Ph.D.

Diplomová práce Bc. Lenky Tiché je zaměřena na studium neurotoxicity těžkých kovů v podmínkách *in vitro* pomocí moderních bioanalytických metod.

Hlavním cílem práce bylo charakterizovat cytotoxické působení  $\text{CdCl}_2$  a  $\text{HgCl}_2$  pomocí bioanalytických a pokročilých mikroskopických metod a porovnat výsledky neurotoxického působení těchto kovů u lidské neuroblastomové buněčné linie SH-SY5Y. Autorka se rovněž věnovala optimalizaci kultivačních podmínek buněčné linie (konkrétně denzity) a také porovnávala toxické účinky kadmia a rtuti s účinky biogenního zinku.

Práce má rozsah 97 stran. Úvodní teoretická část shrnuje mechanismy působení kadmia a rtuti na nervové buňky, věnuje se hlavnímu intracelulárnímu antioxidantu glutathionu a dále popisuje bioanalytické metody, které lze využít pro sledování neurotoxického účinku těžkých kovů. Zvláštní pozornost je věnována stanovení buněčné viability, míry oxidačního stresu a apoptózy. Zde si dovoluji pár poznámek, které však zásadně nesnižují kvality hodnocené práce. Některé informace se zde zbytečně několikrát opakují a poměrně velká část je věnována metodám, které nejsou prakticky používány. Naopak mi zde chybí shrnutí modelů využívaných pro studium neurotoxicity těžkých kovů a podrobnější charakteristika zvolené buněčné linie SH-SY5Y. To je zmíněno až později v diskusi. Na str. 21 je uvedeno: „Jako indikátor mitochondriální funkce může sloužit enzym cyklooxygenáza, protože její dysfunkce zvyšuje tvorbu ROS a zhoršuje energetický metabolismus (Wang and Du, 2013).“ Nejedná se o enzym cyklooxygenázu, ale cytochrom c oxidázu. Za toto nedorozumění však nesou vinu i autoři citované práce, kteří uvedli pouze zkratku COX bez vysvětlení. Stanovení produkce ROS bych možná nezařazovala do podkapitoly možnosti stanovení apoptózy, ale to je pouze osobní názor. Jinak je teoretická část zpracována přehledně a je vidět, že se autorka věnovala tématu intenzivně, což dokládá i úctyhodnými 146 citacemi prací publikovaných převážně v zahraničních odborných časopisech. Text teorie je vhodně doplněn 11 obrázky a schématy.

Z vlastního postupu práce je patrné, že její časová náročnost byla zejména díky potřebě kontinuální kultivace buněčné linie poměrně vysoká. Použité metodiky jsou popsány stručně a dostatečně, jen pozor na uvádění jednotky zásobních a pracovních roztoků (konkrétně Hoechst 33258). Výsledky jsou prezentovány pomocí přehledných grafů, tabulek a kvalitních mikrofotografií buněk a jsou vhodně diskutovány v kontextu s dostupnou odbornou literaturou. Opět si dovoluji jen pár drobných poznámek. Autorka v diskusi uvádí: „Dle tvorby výchlípek na membráně buněk SH-SY5Y lze uvažovat, že se jedná o tzv. bleby, které značí, že by zde mohla probíhat apoptotická buněčná smrt. O apoptóze vyvolané působením kadmia hovoří také několik dalších studií (Branca et al., 2018; Kim et al. 2013). Některé výzkumné práce ale po intoxikaci  $\text{CdCl}_2$  zaznamenaly u buněk SH-SY5Y zároveň indukci

apoptózy i nekrózy.“ Blebování membrány je sice znakem apoptózy, ale může předcházet i nekróze. Domnívám se, že na základě použitých metod nelze jednoznačně určit, jakým konkrétním typem smrti buňky převážně umírají. Dále se v diskusi píše: „Zde uvažujeme o možnosti nekrotické buněčné smrti, jelikož i podle záznamu morfologické analýzy v reálném čase při koncentraci 200  $\mu\text{M}$   $\text{HgCl}_2$  dochází během prvních několika desítek minut k buněčné smrti a oddělení buněk od kultivačního povrchu. Je tedy možné, že neurotoxicita rtuti zahrnuje oba typy buněčné smrti a typ buněčné smrti může také záviset na koncentraci  $\text{HgCl}_2$ “. Na to by se dalo říct vzhledem k tématu práce – na to vemte jed ☺! (platí ale, že by pro odlišení nekrózy a apoptózy měly být použity i další metody, které autorka zmiňuje v teoretické části). Po formální stránce má práce velmi dobrou úroveň a její uspořádání je přehledné. Z jazykového hlediska je práce napsána srozumitelně a množství překlepů, gramatických chyb a neobratných vyjádření je minimální. Po praktické a odborné stránce je práce zdařilá a je přiměřeného rozsahu.

### Otázky do diskuse pro autora:

1. V úvodu píšete: „Pro testování neurotoxicity je s výhodou používán model lidské neuroblastomové linie SH-SY5Y.“ Zajímalo by mě tedy s jakou výhodou? Jaká je metabolická charakteristika této linie a jak se liší od primárních neuronů? Které pasáže jste používali pro experimenty?
2. Je známo, že v metabolismu i poškození neuronů hrají významnou roli gliové buňky. Používají se pro studium neurotoxicity *in vitro* i ko-kultury neuronů a glií?
3. Na obr. 13 v případě 25  $\mu\text{M}$   $\text{HgCl}_2$  se zdá, že je ve všech časových intervalech inkubace výrazně nižší počet buněk. Jedná se o efekt  $\text{HgCl}_2$ , nebo byla ve sledovaném místě hustota buněk nižší i před přidavkem  $\text{HgCl}_2$ ? Na obr. 15 u 25  $\mu\text{M}$   $\text{HgCl}_2$  po 24 hodinách se zdá počet buněk srovnatelný s kontrolní skupinou.
4. Oceňuji, že jste si v rámci diplomové práce musela osvojit řadu metod. Neuvažovali jste také např. o zobrazení mitochondrií event. o měření LDH jako znaku nekrózy? Práce je pěkná a určitě by stálo za to v ní pokračovat.

Oponovaná diplomová práce splňuje vytyčené cíle uvedené v zadání, zpracovává problematiku neurotoxicity těžkých kovů *in vitro* srozumitelně a po obsahové stránce je kvalitním dílem. Na tomto základě tedy diplomovou práci Bc. Lenky Tiché **doporučuji k obhajobě.**

Přiloženou práci hodnotím známkou: **A**

V Pardubicích dne 25. 5. 2022

---

Mgr. Pavla Staňková, Ph.D.