

Oponentský posudek diplomové práce

Název diplomové práce: **Průkaz a sledování enzymu ceramidsyntázy CerS2 ve vybraných tkáních**

Autor práce: **Bc. Alžběta Darvašová**

Vedoucí práce: **prof. RNDr. Zuzana Bílková, Ph.D.**

Konzultanti práce: **Mgr. Ondřej Morávek; MSc. Egzontina Shabani**

Oponent práce: **Mgr. Barbora Jankovičová, Ph.D.**

Předložená diplomová práce se zabývá optimalizací postupu izolace a následné detekce enzymu ceramidsyntázy z různých typů biologického materiálu, jako je jaterní a pankreatická tkáň či dostupnější krevní vzorky. Vedle izolačních metod zahrnujících různé modifikace postupné frakční centrifugace vzorku, byla testována také metoda imunomagnetické separace pomocí specifických protilátek vázaných na povrch magnetických částic. Pro detekci enzymu byly testovány metody gelové chromatografie v kombinaci s Western blot analýzou, případně hmotnostní spektrometrie s různou úpravou a předseparací vzorků.

Práce je strukturována klasickým způsobem a její rozsah činí 151 stran, což je pro tento typ práce spíše nadprůměrné. Po stručném úvodu následuje teoretická část o rozsahu 32 stran, která se věnuje enzymům lipidového metabolismu se zaměřením na ceramidsyntázy a dále pak metodám izolace a stanovení aktivity ceramidsyntázy-2. Následuje formulace cílů diplomové práce, na něž navazuje experimentální část. Ta na 29 stranách detailně popisuje použité metody přípravy vzorků včetně jejich analýzy, a nakonec postup imobilizace specifických protilátek s následným použitím připraveného imunosorbentu k izolaci ceramidsyntázy 2. Výsledky jsou přehledně shrnuty a diskutovány na 48 stranách, kde jsou doloženy formou obrázků či tabulek. Závěr je zpracován na necelé jedné stránce. V průběhu práce i v seznamu literatury, který obsahuje celkem 139 citací, studentka správně používá a dodržuje citační normy.

Práce působí uceleným dojmem s přiměřeným množstvím překlepů a drobných stylistických neobratností. Po formální stránce práce splňuje veškeré požadavky na ni kladené a lze také konstatovat, že bylo dosaženo všech stanovených cílů. Ačkoliv některé experimenty nepřinesly očekávané výsledky, autorka vždy vhodně okomentovala možné příčiny neúspěchu a navrhla další experimentální postupy k jejich řešení. Rozsah získaných výsledků a různorodost použitých analytických metod svědčí o značném úsilí, které autorka do práce vložila.

K práci mám pouze několik drobných připomínek:

- První se týká číslování kapitol. Za „Úvodem“ následují kapitoly 1-4 věnované teorii, poté je zařazena nečíslovaná kapitola „Cíle práce“, a následuje kapitola 5 – „Experimentální část“. Jako vhodnější by se nabízelo označit kapitolu 1 jako „Teoretická část“ a zahrnout do ní

všechny čtyři uvedené teoretické kapitoly. Dále by mohla následovat kapitola 2 – „Cíle práce“, kapitola 3 – „Experimentální část“ atd.

- V kapitolách 3 a 4 je chybně uvedeno číslování podkapitol začínající označením 3.2 a 4.2, namísto správného 3.1 a 4.1.
- V experimentální části jsou na straně 57 duplicitně uvedeny použité protilátky - jednou v „Seznamu chemikálií“, podruhé v „Seznamu biologického materiálu“.
- V textu se ojediněle vyskytují nepřesné formulace, např. na straně 48: „Jako sekundární protilátka byla použita křenová peroxidáza“.

Na studentku mám následující doplňující otázky:

1) Na str. 21 je uvedeno, že se ceramidy podílejí na iniciaci apoptózy, přičemž je zde použit nesprávný termín propapoptický a proapoptický. Jaké by mělo být správné označení a jak konkrétně se ceramidy při apoptóze uplatňují?

2) Pomocí LC-MS analýzy byla potvrzena vysoká míra nespecifické sorpce proteinů ze vzorku na povrch imunisorbentu při imunomagnetické separaci. Moha by být jednou z příčin i nedostatečná blokáce reaktivního povrchu částic? Jakým způsobem by bylo případně možné tento jev omezit?

3) V práci je zmíněna vysoká afinita specifických protilátek vázaných na magnetických částicích jako příčina nedostatečné eluce ceramidsyntázy 2 při imunomagnetické separaci. Jakým způsobem by bylo možné afinitu protilátek experimentálně ověřit?

Závěrem bych ráda podotkla, že i přes výše zmíněné drobné nedostatky se jedná o práci vysoké kvality, v níž byly získány originální výsledky, které bezpochyby přispějí k řešení projektu, jehož byla tato práce součástí. Práci proto **doporučuji k obhajobě** a hodnotím ji známkou **výborně (A)**.

V Pardubicích dne 23.5.2025

.....
Mgr. Barbora Jankovičová, Ph.D.