



Univerzita Hradec Králové
Přírodovědecká fakulta

Univerzita Hradec Králové
Přírodovědecká fakulta

POSUDEK OPONENTA DIPLOMOVÉ PRÁCE

Jméno a příjmení studenta: **Bc. Lada Bělástová**
Studijní obor: 1501 T015/Systematická biologie a ekologie
Studijní program: S16BI001NP
Vedoucí práce: RNDr. Martin Kuneš, Ph.D.
Odborný konzultant: Mgr. Petra Kubincová
Oponent: doc. RNDr. František Malíř, Ph.D.
Katedra: Biologie
Název diplomové práce: **Senzibilizace kůže *in vitro*: Testovací metoda za pomoci Nrf2 ARE-luciferázy**

Skin sensitisation *in vitro*: Testing method using Nrf2 ARE-luciferase

Předložená diplomová práce se zabývá testováním modelových chemikálií se známými účinky na organismus pomocí testovací metody s využitím Nrf2 ARE-luciferázy. Po získání zkušeností s touto prací a s využitím buněčné linie KeratinoSensTM byly otestovány vzorky s neznámými účinky na lidský organismus a zjistit, zda se jedná o látky senzibilizující či naopak ne. Na základě všech provedených experimentů a získaných výsledků bylo úkolem metodu verifikovat a zavést ji do běžné laboratorní praxe Výzkumného ústavu organických syntéz, a.s. Pardubice.

Formální úroveň:

Diplomová práce obsahuje všechny náležitosti, je pečlivě a přehledně zpracována a jednotně zformátována a působí uceleným dojmem.

Struktura/členění diplomové práce:

Práce je psaná standardním způsobem včetně všech požadovaných náležitostí a celkem obsahuje 49 stran textu včetně příloh, literárních odkazů a použitých zkratk a dále obsahuje 11 tabulek a 19 grafů.

Literární zdroje, citace a jejich použití:

Seznam literatury uvádí 43 literárních odkazů včetně 11 internetových odkazů. Podstatnou část tvoří relevantní a recentní literární odkazy zahraničních vědeckých časopisů včetně internetových odkazů, což svědčí o velmi dobré práci diplomantky se zahraničními

databázemi a především jejím dobrým jazykovým vybavení. Citace uvedené v textu i seznam literatury jsou provedeny jednotně.

Teoretická část:

Literární přehled je zpracována velmi kvalitně, vysvětluje termíny jako kožní senzibilizátor a uvádí čtenáře do problematiky testování toxicity, *in vivo* a *in vitro* testů, udává přehled, týkající se počtu testování zvířat v rámci EU a seznamuje čtenáře s příslušnými zákony na zacházení s pokusnými zvířaty, např. směrnice 2010/63/EU a v ČR pak zákon č.246/1992 Sb. na ochranu zvířat v platném znění. Porovnává náhrady *in vivo* metod alternativními metodami s principy 3 R (replacement, reduction, refinement), navrženými v r. 1959. Alternativní metody se týkají jakýchkoliv experimentálních metod, které nevyžadují použití celého zvířete. V současnosti se v toxikologii *in vitro* využívají buněčné či tkáňové kultury a jsou výhodné i z hlediska časové a finanční náročnosti a dále rychlejšího a snadnějšího provedení a poměrně snadné dostupnosti. Nicméně v případě senzibilizace kůže doporučuje ECHA (Evropská agentura pro chemické látky) zrušení *in vivo* testů pouze v případě, že lze *in vitro* generovat dostatek informací.

Metodika a její zhodnocení:

Metodická část úzce navazuje na část teoretickou a zabývá se použitými chemikáliemi, médii, séry a dále jednotlivými testovanými látkami, řeší metodiku práce s buněčnou linií, její charakteristiku, dále doubling time konkrétní postupy testování s modelovými látkami, přípravu roztoků a ředění, měření luminiscence na luminometru a testování neznámých chemikálií. Celkem byly testovány 5 chemických látek, 3 modelové- se známými účinky na organismus v testech *in vitro/in vivo* na modelových organismech a buněčných kulturách pro získání dovednosti s Nrf2-ARE luciferázovou zkouškou (kyselina salicylová, isopropanol, etylen glykol dimethakrylát) a 2 chemické látky s neznámými účinky na organismus (aldehyd aromatické struktury /28/16/, a ester dikarboxylové kyseliny aromatické struktury /3/16/), které byly testovány pro zjištění jejich účinku na buněčnou kulturu KeratinoSensTM (doporučenou OECD Test Guideline 442 D/ OECD, 2015/) v *in vitro* testech na základě získání předchozích zkušeností s modelovými látkami. Pro porovnání toxického působení na buňky byl zvolen parametr IC₅₀, tj. koncentrace vedoucí ke snížení životaschopnosti o 50 %.

Výsledky a jejich zhodnocení:

V rámci celé experimentální části bylo zahrnuto 5 experimentů s duplikáty/triplikáty. Chemické látky byly hodnoceny jako pozitivní (pokud indukce luciferázové aktivity dosahoval hodnoty 1,5 alespoň 2 x ze tří opakování a hodnota EC_{1,5} /interpolované koncentrace vyvolávající 1,5 násobnou indukci luciferázy/ či negativní (pokud nebyla zaznamenána buď žádná statisticky významná indukce či pouze v jednom opakování, nebo pokud byla indukce zaznamenána v koncentraci vyšší než 1 000 μM nebo pouze v cytotoxických koncentracích). Výsledky jsou shrnuty v přehledných tabulkách a grafech.

Diskuze je vedena na odpovídající úrovni a porovnává dosažené výsledky. Na **závěr** studentka stručně shrnuje dosažené výsledky, kterými bylo prokázáno, že kyselina salicylová a isopropanol jsou látky nesenzibilizující, na rozdíl od etylen glykol dimethakrylátu, který senzibilizuje slabě. Oba neznámé vzorky byly, na základě zkušeností, vyhodnoceny jako látky s nesenzibilizujícím potenciálem. Na základě těchto zjištěných experimentálních dat byla metoda verifikována a zavedena do laboratorní praxe pro laboratoř skupiny Genetická toxikologie/Testy *In vitro* výzkumného ústavu organických syntéz, a.s. Pardubice.

Splnění cílů práce:

Cíle práce jsou jasně formulovány. Vytyčené cíle a zadání diplomové práce bylo naplněno.

Závěrem lze říci, že autorka prokázala velmi dobrou orientaci v řešené problematice i vysokou zručnost při vlastní experimentální práci. Velmi si také cením toho, že naše studentka byla schopná se vyškolit v laboratorní experimentální práci v oblasti genetické toxikologie - a to prakticky bez předchozích zkušeností.

Osobně bych byl ještě ocenil alespoň nějakou obrazovou dokumentaci a číslování literatury pro větší přehlednost, i když to úroveň vlastní předložené diplomové práce nesnižuje. Oceňuji osobní přínos studentky v zavedení metody velmi dobře využitelné v laboratorní praxi.

Práce velmi dobře splňuje základní požadavky kladené na tento typ prací, a proto ji doporučuji k ústní obhajobě.

Otázky k ústní obhajobě práce:

1) Co znamená tzv. QSAR analýza a do jaké části toxikologie by ji studentka zařadila a zda má význam tato analýza v souvislosti s principem 3R ?

Datum: 28. 5. 2018

Podpis oponenta diplomové práce:

