

## Posudek diplomové práce

Jméno a příjmení studenta: **Bc. Blanka Florová**

Vysoká škola: **Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích  
Přírodovědecká fakulta**

Název práce: **Studium adhesivity laktobacilů na různé buněčné linie  
v modelu *in vitro***

V současné době je stále více zaměřena pozornost na možnou zdravotní prevenci lidské populace výživou. Na trh jsou uváděny nové výrobky označované jako biopotraviny, potraviny nového typu, funkční potraviny atp. Předností těchto komodit je buď redukovaný obsah látek zdraví nepříznivých, či naopak zvýšený obsah látek zdraví prospěšných. Samostatnou skupinu tvoří tzv. probiotika, tedy potraviny obsahující živé kultury. Studentka Bc. Blanka Florová si tedy pro svoji diplomovou práci vybrala téma vysoce aktuální.

V úvodu autorka podává přehled mikroorganismů, jejich vlastností a podmínek, za kterých mohou být aplikovány v potravinách jako probiotika. Jedním z kritérií je adheze těchto mikroorganismů na sliznice a buňky epitelu či buněčné linie v experimentu. A právě této problematice se autorka předložené studie věnovala experimentálně.

Ve svých pokusech užila jako eukaryotní model lidské buněčné linie HeLa, Caco-2 a linii L929 původně izolovanou z pojivové tkáně myši. Jako reprezentant prokaryotních buněk pro své experimenty zvolila *Lactobacillus mucosae* a to pro prokázanou dobrou vazebnou aktivitu na hlen v podmínkách *in vitro* a antibakteriální aktivitu vůči patogenním bakteriím a rovněž patogenní *Staphylococcus aureus*.

Jasně zformulované cíle práce shrnula do tří odstavců – sledování kinetiky a dynamiky adherence prokaryotních buněk na eukaryotní buněčné linie, studium interakcí prokaryotních a eukaryotních buněk různými zobrazovacími metodami, studium vlivu odstranění proteinových struktur na interakci prokaryotní a eukaryotní buňky. Vhodnými kombinacemi zvolených biologických modelů v experimentech získala výsledky včetně statistického hodnocení a autentických záběrů pořízených zobrazovacími metodami (optickou mikroskopií, mikrokinematografií a skenovací elektronovou mikroskopií) prokazující kvantitativně míru adherence, resp. konkurence obou aplikovaných prokaryontů a rovněž kinetiku studovaných dějů. Zajímavé jsou experimenty studující vliv povrchových proteinů na adhesivitu laktobacilů k eukaryotním buňkám včetně časového faktoru.

Diskuse je věcná, závěry jsou přehledně shrnuty do několika bodů.

Zdůrazňuji náročnost experimentální práce, nezbytnost precizního provedení za přísných podmínek laboratorní práce s živými kulturami a použití náročných instrumentálních zobrazovacích metod.

Toto vše se podařilo autorce zvládnout a získat originální výsledky. Rád konstatuji, že i formální úroveň předložené práce - jazyková a grafická - je na velmi dobré úrovni.

Autorka uvádí solidní seznam literárních zdrojů, ze kterých čerpala – prakticky většinou z prestižních zahraničních odborných periodik.

Autorka v předložené práci prokázala schopnost zpracovat oblast informací na zadané téma, zejména však zvládla náročné laboratorní mikrobiologické metody včetně metod zobrazovacích.

K předložené diplomové práci mám následující připomínky či dotazy:

- Autorka na str. 46 konstatuje, že experimentálně nebyla v této studii potvrzena předpokládaná konkurence v adhesivitě užitých prokaryotů *L.mucosae* D a *S.aureus* na všech užitých buněčných liniích. Dá se předpokládat odlišné chování modelových prokaryotů na jiné eukaryotní linii (kupř. na buňkách zdravé lidské střevní sliznice)? Má takovýto experiment autorka event. v budoucnu v plánu?
- Vzájemnou vazbu obou užitých prokaryotních buněk na linii Caco-2 včetně morfologie pomocí FESEM autorka sledovala v experimentálním uspořádání samostatné kultivace Caco-2 a Caco-2 buněk kokultivovaných s oběma prokaryotními bakteriemi. Je možné předpokládat event. prokázat při experimentálním uspořádání kultivace Caco-2 samostatné s *L.mucosae* a samostatné s *S.aureus* rozdíly ve vazbě obou bakterií k Caco-2 a tím přispět k objasnění konkurence v adhesivitě obou prokaryotních bakterií?
- Formální připomínky: text k obr. 3 na str. 27 by bylo vhodnější umístit pod obrázek, nikoli na str. 28 nahoře, totéž v případě obr. 6 na str. 35. Vedle anotace v úvodu studie a závěru uvedeného v bodech (str.50,51) mohla autorka uvést stručný souhrn či lépe závěr v plynulém textu.

Vytyčené cíle práce byly splněny, stanovená kritéria pro disertační práci byla rovněž splněna, proto tuto práci

**d o p o r u č u j i**

k obhajobě.

Na základě celkového hodnocení práce navrhuji klasifikovat práci

**v ý b o r n ě**



Brno 17. ledna 2013

RNDr. Jiří Totušek, CSc.

## Oponentský posudek diplomové práce Bc. Blanky Florové na téma Studium adhezivity laktobacilů na různé buněčné linie v modelu *in vitro*

Studiu různých vlastností probiotických mikroorganismů je v posledních desetiletích věnována vědeckými pracovníky značná pozornost. Jednou z podmínek dlouhodobého působení probiotik na naše zdraví je jejich životaschopnost v gastrointestinálním traktu člověka a schopnost jejich adheze ke střevní sliznici. Z tohoto pohledu řeší předkládaná diplomová práce velmi zajímavou a aktuální problematiku.

V poměrně kratší teoretické části práce studentka shrnuje údaje o nejdůležitějších druzích probiotických mikroorganismů a účinku jejich působení ve formě tabulek. Z formálního hlediska považují formátování tabulek za ne příliš vhodné, protože jsou takto nepřehledné (rozložení na několika stránkách, viz tab. I a další). Z mého pohledu snižuje kvalitu rešeršní práce skutečnost, že nebyla k tématu zpracována nejnovější publikovaná literatura; v přehledu použité literatury se prakticky neobjevují práce publikované v posledních pěti letech. Na str. 1 a v Tab. 1 bych chtěla upozornit, že správný název kvasinkového probiotického kmene je *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*, stejně tak komerční kmen Bb12 je správně identifikován jako *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*.

V metodické části práce jsou popsány použité materiály a techniky, které korespondují se současnými moderními metodami testování adhezních vlastností. Nepovažuji za účelné vypisovat složení běžně používaných médií, ať už se jedná o MRS či MEM médium. V takovémto případě stačí popsat případné přídavné látky odlišné od složení výrobce. U jednotlivých použitých metod by měla být uvedena citace. V popisu metod ani ve výsledkové části jsem nenašla, kolikrát byl daný pokus opakován nebo zda jsou uvedené výsledky pouze vždy z jedné kultivace.

Můžete vysvětlit, proč byl k práci vybrán právě druh *Lactobacillus mucosae*, který byl izolován z trávicího traktu ovce? Vykazuje tento kmen nějaké specifické probiotické vlastnosti? Jaký je Váš názor na použití probiotických kmenů izolovaných z nehumánních zdrojů pro lidskou výživu?

V metodické části by měla být rovněž popsána a citována použitá statistická metoda pro vyhodnocování výsledků. Jaká byla zvolena hladina významnosti  $\alpha$ ?

V experimentální části práce byla naměřena celá řada zajímavých výsledků, které jsou shrnuty v tabulkách a grafech. Je třeba ocenit zařazení hodnocení adheze i pomocí elektronového mikroskopu. K této části práce mám následující připomínky a dotazy:

- obrázky, které byly pořízeny optickým mikroskopem, by měly obsahovat měřítko, neboť pouhé uvedení celkového zvětšení mikroskopu při počítačové zpracování obrázku nedává jasnou představu o skutečné velikosti preparátu
- za nedostatečné považuji popis obrázků a os u jednotlivých grafů (procenta čeho?); např. u obr. 16 by mělo být specifikováno, o jaké buňky se jedná apod.
- můžete popsat přesněji záznamy na obr. 11 – 13, o jaké rozdíly se jedná, díky kvalitě tisku to není zcela patrné
- čím si vysvětlujete tak velké rozdíly v adhezi mezi Caco-2 buňkami a HeLa buňkami? Můžete srovnat Vaše výsledky s výsledky jiných autorů?

Z formálního hlediska je práce na dobré úrovni, obsahuje minimum překlepů (použití desetinných čárek v anglickém textu, str. 4 Bezpečnost, atd.), je bez gramatických chyb. Doporučovala bych sjednocení některých používaných termínů (adheze – adherence; xylén - xylen), jelikož se jedná o práci psanou v českém jazyce, bylo by vhodnější používat zkratku KTJ/ml místo cfu/ml. Pozornost by měla být věnována psaní názvů mikroorganismů kursivou (např. str. 22 v názvu kapitoly, v obsahu práce apod.).

V seznamu literatury jsem nenašla některé citované autory (např. str. 49: Florová, 2010), v případě citace stejného autora ze stejného roku je potřeba rozlišit odkazy (Ouweland a kol., 2001a; poté 2001b).

Závěrem mohu konstatovat, že diplomantka splnila požadavky kladené na naměření diplomové práce, získala celou řadu důležitých poznatků o zkoumaném kmeni *Lactobacillus mucosae*, které budou jistě využity v další práci.

Vzhledem k výše uvedeným připomínkám ke zpracování diplomové práce hodnotím práci sl. Blanky Florové **klasifikačním stupněm dobře a doporučuji ji k obhajobě.**

V Praze dne 21. 1. 2013

Šárka Horáčková  
Ing. Šárka Horáčková, CSc.  
Ústav mléka, tuků a kosmetiky  
Vysoká škola chemicko-technologická v Praze