

Oponentský posudek

## **Diplomová práce: Vliv vybraných zánětlivých agens na proces osteoklastogeneze**

**Bc. Patrik Škubica**

**Diplomová práce je po stránce obsahové i formální precizně zpracovaná.**

### **Obsahová stránka:**

Teoretická část prezentuje aktuální poznatky z osteologie, v druhé části je dostatečně vysvětlena patologie u céliakie a její vztah k rozvoji osteoporózy. Zvláštní kapitola je věnována vztahu cirkulující DNA a autoimunitních chorob.

Autor jasně a přitom stručně vysvětluje jak fyziologické, tak patologické děje během osteogeneze. Věnuje zvláštní pozornost buňkám, které se podílejí na remodelaci kosti. Autor se věnuje, vzhledem k tématu práce, především osteoklastům. Přehledně je vysvětlena osteoklastogeneze jak z hematopoetických buněk, tak periferních prekurzorů. Autor předkládá řadu obrázků upravených (citace jsou vždy správné), ale i originálně vytvořených (např. působení zánětlivých faktorů na diferenciaci osteoklastů z monocytů). Obrázky i text jsou velmi přehledné. Rovněž vztah vybraných prozánětlivých cytokinů (TNF- $\alpha$ , IL-6 a IFN- $\gamma$ ) k maturaci osteoklastů a vztahu ke kostní remodelaci je dostatečně vysvětlen.

Cíle diplomové práce: Autor si klade za cíl zjistit, zda sérum pacientů s céliakií (a zvláště cytokiny TNF- $\alpha$ , IL-6 a IFN- $\gamma$  a cirkulující DNA) přispívá k diferenciaci monocytů v osteoklasty.

Hypotézy jsou formulovány jasně.

Metodika: Jednotlivé metody použité pro studii jsou adekvátní. Protokoly pro jednotlivé části studie jsou ukázány přehledně a jsou reprodukovatelné. Dárci biologického materiálu jsou jak pacienti s céliakií (nově diagnostikovaní i ti na dietě) a zdraví jedinci.

Výsledky: Výsledky jistě ovlivňuje relativně malý počet subjektů, kteří byli zavzati do analýz (cytokinová studie 14 pacientů s céliakií a 7 zdravých kontrol a pro analýzu cfDNA 10 zdravých jedinců a 10 pacientů s nově diagnostikovanou céliakií).

Ani jeden ze sledovaných cytokinů ani cfDNA nebyly zvýšeny u nemocných céliakií oproti zdravým kontrolám. Navzdory tomu, séra nově diagnostikovaných pacientů s céliakií vedla k vyšší diferenciaci osteoklastů z monocytů. Při sledování vlivu všech tří cytokinů na osteoklastogenezi se ukázal statisticky významný rozdíl pouze u IL-6, resp. TNF- $\alpha$ . Nicméně, exprese genů ACP5, CTSK byla v osteoklastech snížena. Kultivace bez cfDNA (se sérem ošetřeným DNázou) vzniklo o 65% méně osteoklastů, avšak u genů ACP5 a CTSK byl pozorován trend ke zvýšení exprese v kultivacích bez cfDNA.

Diskuze

V diskuzi je věnována podstatná část výhodám a nevýhodám zvolené metodiky. Velmi oceňuji kritické hodnocení vlastní práce, které patří k základním vědeckým vlastnostem.

#### **Formální stránka:**

Práce obsahuje všechny formální součásti diplomové práce.

Literatura je citována adekvátně, rozsah prostudované literatury je přiměřený.

V práci se vyskytují ojedinělé překlepy a ne zcela správná syntax.

#### **Dotazy:**

##### 1. Ad metodika:

- a. Všichni dárci biologického materiálu vyplňovali dotazník. Prosím, uveďte, jaké parametry dotazník obsahoval a proč.
- b. Jak správně uvádíte, vitamin D má významnou roli v diferenciaci kostních buněk. Měli jste ve Vaší práci k dispozici data ohledně hladin vitaminu D u pacientů s céliakií a zdravých jedinců? U nemocných s céliakií mohou být hladiny vitaminu D významně ovlivněny, nicméně i v běžné populaci v našich zeměpisných šířkách mohou mít zdraví jedinci nízké hladiny tohoto hormonu. Prosím, uveďte, zda jste tyto informace zohledňovali v pokusech.
- c. V závěru práce zvažujete použití jiné metodiky k sledování role cfDNA než Vámi použitou metodu s DNázou. Na začátku Vaší práce jste prováděli experimenty, díky kterým jste zvolili právě Vámi využívanou metodu s DNázou?

##### 2. Ad výsledky a diskuze:

- a. Výsledky jsou zpracovány přehledně a jasně. Které faktory se, podle Vás, mohou podílet na diskrepanci mezi zvýšenou osteoklastogenezí a expresí ACP5, CTSK a CALCR?
- b. Volná cirkulující DNA se objevuje u řady patologických stavů i zdravých osob. Prosím, uveďte, rozdíly v detekci volné cirkulující DNA původu jaderného a mitochondriálního.
- c. U samotné Vámi studované céliakie: pravděpodobně budete rozšiřovat studii s počtem nemocných. U Vaší práce jste prozatím nereflektovali stupeň aktivity onemocnění podle střevní biopsie. Plánujete sledovat tíž onemocnění s aktuální hladinou cfDNA, resp. cytokinů (kterých)?

**I přes malé, výše uvedené, nedostatky hodnotím tuto práci jako vysoce kvalitní. Autor jednoznačně prokázal schopnost zpracovat téma jak teoreticky, tak prakticky.**

**Diplomovou práci Bc. Patrika Škubici doporučuji k obhajobě.**

**Návrh klasifikace: Výborně**

**MUDr. Markéta Hušáková PhD**

**Revmatologický ústav a Oddělení revmatologie 1. LF UK, Na Slupi 4, 128 50 Praha 2**