

Oponentský posudek na diplomovou práci „Stanovení exprese molekul transportu a metabolismu železa u vybraných chronických onemocnění“ předkládanou Bc. Jitkou Chmelíkovou v rámci magisterského studia na Přírodovědecké fakultě UK

Autorka výše uvedené diplomové práce se zabývala stanovením exprese genů) regulujících metabolismus železa (konkrétně DMT1, Dcytb, ferroportin a hefeistin) u pacientů diagnostikovaných s hereditární hemochromatózou, sideropenickou anémií a alkoholovým onemocněním jater. Expresse byla stanovena na úrovni proteinové i mRNA a dalším cílem studie bylo stanovení exprese klíčového regulátoru železového metabolismu, hepcidinu.

Literární údaje o expresi proteinů regulujících metabolismus železa u klinických pacientů trpících nadbytkem či nedostatkem železa jsou zatím spíše kusé a někdy protichůdné, zvolené cíle tudíž považuji za zajímavé a přínosné. Zvláště zajímavé je zjištění, že exprese výše zmiňovaných proteinů příliš nekoreluje s expresí jejich korespondujících mRNA, což je skutečně možné vysvětlit posttranskripčními a posttranslačními modifikacemi. Navozuje to zde otázku, zda v těchto případech nehrají roli tzv. microRNA, které převážně fungují jako translační represory a blokuji tak přenos zvýšené mRNA na proteinovou hladinu.

Práce je členěna do 8 kapitol a obsahuje i přílohy typu seznam obrázků a tabulek plus tabulky popisných statistik. Jde o práci čítající 109 stran, což je určitě nadprůměrný počet a v práci je jasně řečeno, že ne všechny výsledky byly získány autorkou, ale byly zahrnuty i výsledky od spolupracovníků. Obecně považuji práci za velmi zdařilou, poskytuje velice dobře zpracovaný literární přehled a úvod do problematiky, cíle práce jsou jasně definovány a jejich splnění je dokumentováno v závěru. Výsledky jsou prezentovány přehledně a sofistikovaně vyhodnoceny za pomoci rozličných statistických testů. Je třeba zde podtrhnout vhodně zvolenou metodiku, kdy bylo nejdříve testováno normální rozložení a na základě nesplnění normální distribuce byly použity neparametrické testy. Technická stránka zpracování je na vysoké úrovni, práce neobsahuje překlepy a je logicky řazena. K práci mám několik dotazů a připomínek:

- 1) Autorka popisuje agarózovou elektroforézu použitou pro detekci RFLP na straně 32 a popisuje použití 4% agarózy. Myslím, že v tomto případě kdy je potřeba odečítat velice malé fragmenty je vhodnější použít polyakrylamidový gel. Tím nezpochybňuji získané výsledky, pouze dávám doporučení.
- 2) Obrázek 9 a obrázek 10 zobrazující proteinovou expresi ferroportinu a Dcytb lze podle mého názoru zpochybnit, protože je zde vidět několik proužků/velice slabá reakce a jelikož zde není vidět celá membrána je otázkou zda vybrané proužky jsou skutečně specifické.
- 3) U výsledků western blotu a jejich vyhodnocování je obšírně popsána metoda jakou byly získány densitometrické hodnoty, je zde ovšem také zmíněno, že v důsledku nedostačující kapacity elektroforetických aparatur bylo nutné analýzu provádět na více membránách a jako standard byl použit vzorek, který již byl stanoven. Podle mého názoru by bylo ovšem správné na každou membránu použít jeden stejný kontrolní vzorek na který se poté budou vztahovat vzorky ostatní. Je ovšem možné, že limitujícím bylo též množství získaného lyzátu, v tom případě bych doporučil použít rekombinantní protein jako standard, pokud je komerčně dostupný.
- 4) Prezentované obrázky 12-27 jsou ve formě sloupcových grafů opatřených standardními odchylkami. Z popisků není zřejmé zda se jedná o Standard Deviation (SD) nebo Standard Error of Mean (SEM). Osobně bych preferoval grafické vyjádření, kdy je každá hodnota zobrazena jako bod, tzv. Scatter plot, a každý sloupec pak je prezentován jednotlivými body a úsečkou zobrazující průměrnou hodnotu +/-SEM nebo SD. Výhodou je potom to, že lze sledovat distribuci a variabilitu dat uvnitř daného souboru a je tak vidět, zda daná odchylka je dána několika odlehlými hodnotami nebo ne, což by přidalo prezentovaným datům na informační hodnotě.

- 5) Kapitola výsledků 5.3 by dle mého názoru mohla být členěna poněkud jinak (třeba rozdělením do podkapitol), bylo pro mne trochu matoucí číst např. na straně 58 o expresi hefestinu když graf který se k popisu vztahuje je až na další straně.
- 6) Autorka nezmiňuje publikaci Kelleher et al., *Gut* 2004, **53**: 1174-1179, která se zabývala pacienty s hereditární hemochromatózou před a po léčbě flebotomií a též pacientů s nedostatkem železa. Tito autoři došli k závěru, který se shoduje se závěrem autorky, to jest, že pacienti s hereditární hemochromatózou zvyšují expresi DMT1 mRNA po terapii pomocí flebotomie. Autoři také ukazují, že pacienti trpící nedostatkem železa, vykazují vyšší expresi DMT1 mRNA, stejně jako skupina pacientů trpících sideropenickou anémií ve studii autorky. Podobně studie autorů Gleeson et al., *Blood Mol. Cell Dis.* 2005, **35**: 303-308 se zabývala expresí Dcytb a Hp u pacientů s HH, po léčbě flebotomií a u jedinců s deficiencí železa. Tato studie nedetekovala žádnou změnu v expresi mRNA testovaných molekul (stejně jako autorka). Je třeba dodat, že obě zmíněné studie pracují s nižšími počty pacientů s deficiencí železa (oproti autorčině studii), a pacienti trpící nedostatkem železa byli detekováni na základě hladin sérového ferritinu a ne anemie. Studie také nestanovily korelaci mezi expresí vybraných markerů na úrovni mRNA a proteinu, takže autorka přináší nové informace a větší soubor, nicméně myslím, že zmíněné práce měly být zařazeny a diskutovány.
- 7) Stanovení aktivní formy hepcidinu překvapivě neukázalo snížený hepcidin u IDA pacientů ani změnu hladiny u pacientů s hemochromatózou. Ve studii publikované kolektivem autorů Lasocki et al. *Intensive Care Med.* 2010, **36**: 1044-8 se uvádí jako prahová hodnota cirkulujícího hepcidinu při nedostatku železa 129,5 ng/ml, zatímco ostatní subjekty netrpící nedostatkem železa měly průměrnou hodnotu 526,6 ng/ml. Lze se jen domnívat, proč hodnoty hepcidinu na Obr. 38. jsou řádově nižší. Je možné, že aktivní hepcidin je nestabilní a v séru nevydrží dlouho, a nižší hodnoty mohou být způsobeny delším skladováním nebo nějakým technickým problémem při přípravě séra. Každopádně zahrnutí ELISY pro hepcidin do diplomové práce hodnotím vysoce kladně, protože souprava pro jeho stanovení byla uvedena na trh teprve před rokem a jeho použití v této studii bylo pro mne příjemným překvapením i když je pravděpodobné, že metoda bude potřebovat ještě nějakou optimalizaci.

Souhrnně hodnoceno, práce je podle mého názoru vysoce kvalitní, ukazuje na schopnost autorky analyzovat literaturu, sledovat nejnovější vývoj v oboru, provádět pokusy a relevantně je hodnotit a prezentovat. Diplomovou práci tedy zcela jistě doporučuji k obhajobě a přeji autorce mnoho dalších vědeckých úspěchů.

V Praze dne 7. 9. 2010

Mgr. Jaroslav Truksa Ph.D.