

## Oponentský posudek

Diplomová práce:

**Bc. David Šubjak**

*Imunologický profil u pacientů s roztroušenou sklerózou*

Bc. **David Šubjak** předkládá k obhajobě práci s názvem "*Imunologický profil u pacientů s roztroušenou sklerózou*". Práce byla vypracována na Mikrobiologickém ústavu AV ČR, v. v. i. v Laboratoři přirozené imunity, pod vedením MUDr. Anny Fišerové, Ph.D.

Předložená diplomová práce je zaměřena na roli NK buněk, T lymfocytů a monocytů v patogenezi roztroušené sklerózy (RS), jejich fenotyp a funkci v autoimunitní reakci u pacientů nově diagnostikovaných a po následné terapii přípravkem Avonex (IFN $\beta$ 1a). Pomocí průtokové cytometrie bylo analyzováno zastoupení NK, NKT, T lymfocytů a monocytů se zaměřením na expresi inhibiční molekuly CD161 a aktivační molekuly NKG2D.

U pacientů byly zjištěny zvýšené frekvence CD161+ buněk v subpopulacích NK CD56bright, NK CD56dim, Th, Tc CD8bright, Tc CD8dim a snížené počty buněk nesoucí znak NKG2D u subpopulací NK CD56bright, NK CD56dim, Th, NKT, Tc CD8bright, Tc CD8dim a monocytů. Redukovaná cytotoxická aktivita NK buněk u neléčených pacientů korelovala se zvýšenou expresí inhibičního CD161 a sníženou expresí aktivačního NKG2D receptoru.

**Nejvýznamnějším nálezem této diplomové práce je především to, že po léčbě Avonexem se funkční aktivita NK buněk vrátila na hodnoty zdravých dárců, což představuje slibný výsledek především s ohledem na možné využití v lékařské praxi např. k monitorování odpovědi na léčbu.**

Práce je členěna klasicky na kapitoly Úvod, Literární přehled, Experimentální část, Metody, Výsledky, Diskuse, Závěr, a přehled citovaných prací. Celkem má práce 76 stran, text členěný do 8 kapitol. Po obsahové a formální stránce je práce dobře provedena. Strukturalizace textu je srozumitelná, logická, je přehledná a splňuje formální požadavky na tento typ práce.

Stylistická i pravopisná úroveň je dobrá, i když autorovi sem tam unikly některé překlepy (např. „We observed increase counts“ ... nebo za subpopulations by měla následovat předložka of na str. 2 anglického abstraktu) a některá slovní spojení typu „double negativní (na str. 21) nebo „široký negativní regulátor“ na str. 26 anebo „boublet“ na str. 38. Lepší orientaci v textu

Literárnímu přehledu by napomohlo správné řazení a umístění obrázků: na str. 16 je uveden obr. 1, ale za ním následuje obr. 5. a po něm obr. 2, 3, 4. Odkazy k obr. 1 a obr. 5 v textu chybí. Obr. 1 byl zvolen velmi správně, vzhledem k jeho komplexitě by bylo vhodnější jej v textu poněkud širěji rozvést.

Metodická část je dostatečně podrobná, experimentální procedury jsou popsány důsledně a srozumitelně a umožňují snadnou reprodukovatelnost práce.

Grafy a tabulky ze v sekci Výsledky jsou přehledné a jsou vhodným doplněním textu, drobnou výhradu bych měla jen k tomu, v příslušných textových částech chybí hodnota N, tj. kolik bylo testováno kontrol a osob pro tu kterou subpopulaci, jaký byl rozsah získaných hodnot (případně graficky demonstrována distribuce hodnot), jaká byla směrodatná odchylka a 95% CI interval (zvláště s ohledem na to, že kontrol bylo 118 a pacientů 34).

Posudek – diplomová práce – Šubjak – strana 1/3

Literární přehled je dobře napsaný, obsahuje úctyhodných 104 citací, je relevantní a zahrnuje všechny důležité výchozí poznatky tématu. Vytknout lze jen nejednotnost ve formátu citací, kde některé jsou citovány jako např. „Sotgiu et al. 2004 ...“ a u jiných je uvedeno více autorů – viz str. 74 kapitoly 7 literatura.

Diskuse je řazena v logickém uspořádání k získaným výsledkům a poskytuje interpretaci získaných dat. Veškeré výsledky jsou konfrontovány a diskutovány s již publikovanými nálezy. Je škoda, že v diskuzi chybí kritické zhodnocení limitací této diplomové práce a prospěl by jí také nějaký pokus o biologickou hypotézu uvádějící získaná data do širšího kontextu v rámci přirozené imunity na pozadí autoimunitního onemocnění.

K práci mám následující otázky:

1. Na str. 37 je na obr. 5 uveden způsob definování a detekce jednotlivých populací, kde z obr B) je patrné, že do PI negativních buněk (C) jsou zahrnuty lymfocyty i monocyty, tedy tzv. lymfomonogate, což je běžně používáno. V textu výsledků jsou ale subpopulace T lymfocytů a monocyty vztahovány k lymfogate respektive k monogate. Bylo-li tomu tak, pak je nutně toto znázornit ve zmíněném obrázku.
2. Autor uvádí na str. 12 v Literárním přehledu, že RS se manifestuje ve čtyřech základních formách. Zkoušel autor vyhodnotit naměřené frekvence jednotlivých subpopulací v rámci těchto skupin (to by ostatně bylo velmi přínosné i z hlediska teoretické znalosti patogeneze RS)? Pokud ano, lišily se jednotlivé formy mezi sebou? Pokud ne, existuje nějaký předpokládaný rozdíl a jaký?
3. Jaké bylo rozložení pohlaví u kontrol a pacientů s RS, byl zohledněn uváděný poměr ženy:muži (2-3:1)?
4. Proč byly stanoveny intervaly jednotlivých odběrů – II. odběr po 2-4-týdnech, III. po 5-9 týdnech a IV. po 10-16 týdnech? Ze zkušenosti s anti-TNF léčbou nebo aplikací rekombinačního IL-1RA je známo, že ty největší změny se odehrávají několik hodin až desítek hodin po aplikaci léku.
5. Bylo možné zjištěné rozdíly ve frekvencích jednotlivých buněčných subpopulací nalézt také u jejich absolutních počtů?
6. Z grafů na str. 45 a 46 je patrný opačný trend v expresi CD161 a NKGD2 např. u souboru vzorků odebraných po 10-16 týdnech (tj. odběr IV). Prováděl autor korelační analýzu např. mezi cytokin-produkujícími a cytotoxickými buňkami?
7. Jak byly získávány efektorové cytotoxické buňky? Byly sortovány?
8. Bude reálné využít výsledky v monitorování odpovědi na léčbu klinickými pracovišti?
9. Plánuje autor na dané problematice dále pracovat a doplnit studii expresní analýzou např. transkripčních faktorů, případně kináz a fosfatáz k objasnění intracelulárních molekulárně biologických procesů s ohledem na použitou terapii? Taková analýza by jistě celou práci ještě více zkvalitnila tak, aby ji bylo možno publikovat v dobrém zahraničním časopise.

Závěr:

Práce splnila všechny zadané cíle a celkově hodnotím tuto diplomovou práci jako kvalitní rukopis. Po doplnění expresní analýzy ji bude jistě možné publikovat v některém z renomovaných

zahraničním časopise. Jsem přesvědčena, že práce odpovídá standardům v rámci kvality výzkumu požadovaném pro diplomovou práci, a proto tuto diplomovou práci doporučuji k obhajobě.

V Praze 12.9.2012

  
RNDr. Šárka Růžicková, Ph.D.

Laboratoř imunopatologie a imunoterapie  
Biotechnologický ústav AV ČR, v. v. i.  
Václavská 1083  
Praha 4  
142 20  
tel: +420 241 06 3620  
+420 241 06 3602  
fax: +420 244 471 707  
e-mail: sarka.ruzickova@img.cas.cz  
website: www.ibt.cas.cz