

Posudek na diplomovou práci Bc. Michaeli Karlické

Název práce: **Vliv váhového úbytku obézních subjektů na sekreční schopnosti adipocytů a analýza markerů stresu endoplazmatického retikula v průběhu adipogeneze**

Cílem předkládané diplomové práce bylo analyzovat vzorky tukové tkáně u 22ti premenopauzálních žen před a po podstoupení dietní intervence v průběhu 5ti až 6ti měsíců. Odebrané vzorky tukové tkáně měly být použity pro *in vitro* kultivaci adipocytů pro následnou analýzu sekrece adipocytokinů (adiponektin, IL6, MCP1) a analýzu zastoupení jednotlivých frakcí adiponektinu během kontrolních podmínek a indukované lipolýzy. Dále u vybraných subjektů měly být *in vitro* kultivované preadipocyty použity k zmapování genové exprese proteinů endoplazmatického retikula (ER), sloužících též jako markery stresu endoplazmatického retikula, během diferenciací adipocytů.

Text diplomové práce má celkem 78 stran složený z následujících kapitol: český a anglický abstrakt (po jedné straně), úvod (1 strana), cíle (1 strana), literární přehled (16 stran), materiál a metody (13 stran), výsledky (3 strany), diskuze (3 strany), závěr (1 strana), seznam použitých zkratk (6 stran), použitá literatura (10 stran), přílohy: tabulky, grafy, obrázky (8 stran).

Kapitola **úvod** stručně uvádí do problematiky obezity a s ní spojené onemocnění chronický zánět, tukové tkáně ve smyslu endokrinního orgánu a stresu endoplazmatického retikula jako potenciálního aktivátora signálních drah vedoucích k produkci prozánětlivých cytokinů.

V literárním přehledu autorka shrnuje celkem dostatečně současné poznatky o tukové tkáni, obezitě a s ní spojeným zánětem, a o endoplazmatickém retikulu. Citace jsou v časovém rozsahu z posledních 15ti let, převážně z vědeckých článků, ale lze najít i knižní publikace a webové odkazy. K vlastnímu zpracování mám tyto poznámky. Nechápu označení podkapitoly 4.6. Zánět a stres endoplazmatického retikula, kde na 9ti řádcích není nic nového v souvislosti endoplazmatického retikula jako aktivátoru zánětu/zánětlivých cytokinů než bylo naznačeno v kapitole **úvod** a další podkapitola 4.6.1 Endoplazmatické retikulum se tím již nezabývá. Věta "Mezi nejvýznamnější patří interakce s adiponektinovým receptorem interagujícím proteinem 1 (APPL 1), která vede k AMP aktivaci kaskády proteinkinázy (Mao et al., 2006)" v sobě skrývá jednak vymyšlený vysvětlující text zkratky proteinu APPL1 a zároveň je nesrozumitelná/neúplná díky tomu, že není uvedeno, o jakou kaskádu či kinázu se jedná. Překvapující je uvádění nesprávných textů k vysvětlení zkratk genů nebo proteinů (APPL1, BiP, GBP28), pokud má autorka přístup k online databázím a zároveň je používá jako citaci. Webová citace je sice chybně napsaná, ale přesto věřím, že s ní autorka pracovala. Dále se v celé práci chybně píše adrenerdní místo adrenergní. V příloze jsem našel dva převzaté obrázky (obrázek 3 a obrázek 4) bez uvedeného zdroje, navíc na ně není odkaz ani ve vlastním textu literárního přehledu. Předpokládám, že měly sloužit k demonstraci právě v této kapitole.

Doporučoval bych sjednocení termínů jako triglyceridy/triacylglyceridy, zánětlivé/inflamační, 3x/3 krát apod., jedná-li se o vyjádření téhož, a raději použít jednoduchého opisu místo novotvarů jako např. "bílotukové".

Kapitola **Materiál a metody** obsahuje 4 skupiny metod (práce s tkáňovými kulturami, izolace RNA s přepisem do cDNA a finální analýzou pomocí qRT-PCR, fluorescenční mikroskopii a poslední nativní gelová elektroforéza a následný western blot), zpracována je ovšem do 18 paralelních kapitol a několika podkapitol bez logického nebo systematického uspořádání. Např. podkapitola 5.5.1. Výroba paraformaldehydu je popis přípravy roztoku (ne výroba), ale u jiných metodik přípravě roztoků samostatné podkapitoly věnovány nejsou. Dále lze najít obsahové duplicity kapitol (barvení ER), jednovětné kapitoly, nepřesné vyjádření např. kapitola 5.13 Stanovení celkových proteinů (chybí čeho tzn. koncentrace), chybné označení např. primery = oligonukleosacharidy, odkaz na SybrGreen

jako master mix a jinde jako primery, chybné míchání reagentů, jež by nevedlo k požadovanému výsledku. Doporučení k uspořádání je vyčlenit podkapitolu materiálu tzn. seznam chemikálií, komerčních produktů a použitých roztoků s jejich složením a v mechanickém postupu metody se zaměřit jen na její popis.

V kapitole **výsledky** autorka ukazuje, že dietní intervence měla významný vliv na některé antropometrické a metabolické parametry jako je redukce váhy, BMI, množství tuku, cholesterolu, insulinové rezistence, avšak nevedla k žádným změnám u většiny sekretovaných adipocytokinů (adiponektin, IL6, MCP1) jak v bazální tak v indukované lipolýze. Jediná statisticky významná změna následkem dietní intervence byla v zastoupení jednotlivých izoform adiponektinu během dbcAMP indukované lipolýzy. V druhé části kapitoly výsledky autorka sledovala průběh diferenciacie adipocytů na základě zvýšené exprese markerů aP2 a PPARy. Zároveň se pokusila analyzovat faktory ER spojené se stresem ER. Většina těchto analyzovaných faktorů ER však vykazovala minimální nárůst exprese. Bohužel analýza případných morfologických změn ER na základě barvení specifických faktorů spojených se stresem ER neposkytla dostatečné množství dat z technických důvodů.

Komentáře: Struktura členění cílů a jejich splnění v kapitole Výsledky by měla být podobná. Kapitola analyzující antropometrické a metabolické parametry testovaných subjektů před a po dietní intervenci není uvedena jako jeden z cílů práce. Autorka odkazuje obecně na kapitolu 12 obsahující všechny přiložené grafy bez označení konkrétního grafu. Bohužel celý odstavec popisující výsledky indukce lipolýzy isoproterenolem postrádá odkaz na nějaké vyjádření výsledků. Stejná kapitola obsahuje protichůdná vyjádření "Isoproterenol v buňkách nebyl schopen změnit sekreci ani jednoho z analyzovaných cytokinů viz kap 12. Nicméně signifikantní účinek isoproterenolu byl zaznamenán po normalizaci na množství proteinů pro IL6". Strohý popis ke grafům, grafy qRT-PCR jsou bez popisu y osy, legenda GUSB (bez vysvětlení zkratky) se vyskytuje u většiny grafů, místo genu, který měříme, chybějící odkazy na výsledky (graf 1, obrázek 2). Doporučuji pro lepší přehlednost označit graf, western blot, mikroskopický snímek jako Obrázek s pořadovým číslem a vkládat přímo do kapitoly výsledky.

Diskuze srovnává získané výsledky sekrece adipocytokinů s údaji publikovanými v literatuře a snaží se na jejich základě nalézt možné vysvětlení. Část věnována genové expresi faktorů ER spojených se stresem je spíše krátké souhrné vyjádření výsledků.

Závěr obsahuje bodově seřazené dosažené výsledky celé práce.

Seznam zkratk trpí řadou nedostatků (chybné vysvětlení, překlepy, nevyskytující se zkratky v textu)

Seznam použité literatury je dobře zpracován s abecedním řazením citací.

Celkové zpracování diplomové práce není dobré: nevhodná struktura podkapitol, neshodné číslování kapitol v obsahu a jiné ve vlastním textu zejména v kapitole metody, nepřesné vyjadřování s řadou chyb a formálních nedostatků, nedostatečný popis grafů. Pozitivně lze hodnotit splnění většiny předsevzatých cílů, proto doporučuji práci k obhajobě před komisí a navrhuji hodnocení **dobře**.

Otázky:

V literálním přehledu zmiňujete u tukové tkáně její vlastnost mechanické opory. Co tím myslíte?

V poslední kapitole obrázky je vyobrazen WB s detekovanými izoformami adiponektinu. Z obrázku je zřejmá silná redukce všech izoform adiponektinu u obézní tukové tkáně ve srovnání se štíhlou tukovou tkání. Nicméně výsledek z ELISA assay (Graf 1) ukazuje na stejné množství adiponektinu ve vzorcích bazální lipolýzy před a po dietní intervenci. Jak si tyto odlišné výsledky vysvětlujete?

Sekrece IL6 je dramaticky zvýšena za podmínek stimulované lipolýzy (Graf 2). Jaký by mohl být fyziologický význam tohoto jevu?

Který gen sloužil k normalizaci a z jakého důvodu byl použit v kvantifikaci qRT-PCR genů aP2, PPARy, ATF3, HSPA5 (Graf 5, 6, 7, 9) v procesu diferenciacie adipocytů?

|
RNDr. Michal Koc, Ph.D
Ústav molekulární genetiky AV ČR
Vítěňská 1083
142 20 Praha 4 Krč

V Praze dne 4.9.2012