

Oponentský posudek na diplomovou práci Bc. Alžběty Zinkové,

studentky Katedry antropologie a genetiky člověka, Přírodovědecké fakulty Univerzity
Karlovy v Praze

ÚLOHA MONOCYTŮ A NESPECIFICKÉ IMUNITY V DIABETU

Školitel diplomové práce: RNDr. Pavlína Čejková, Ph.D., Katedra antropologie a genetiky
člověka, Přírodovědecká fakulta UK v Praze

Předkládaná práce, jež byla vypracována na Katedře antropologie a genetiky člověka Přírodovědecké fakulty UK, studuje vhodnost použití různě ošetřené periferní krve v expresních studiích, dále se věnuje expresnímu profilu genů pro PRL, TLR2 a TLR4 na monocytech pacientů s diabetem a konečně charakterizuje u pacientů s diabetem samotné monocyty z hlediska exprese proteinů TLR2, TLR4 a CD14. Práci doplňují testy optimalizace experimentálních podmínek pro stimulaci izolovaných primokultur monocytů. Autorka sleduje aktivitu a význam monocytů prostřednictvím jejich povrchových molekul, jako složky vrozené imunitní odpovědi a hledá jejich souvislost s etiopatogenezí Diabetes mellitus. V práci byla v monocytech pacientů s diabetem a v kontrolním souboru provedena analýza exprese PRL, TLR2, TLR4 na úrovni mRNA, byla stanovena přítomnost proteinu TLR2 a TLR4 a sledována byla také intenzita exprese CD14.

Práce o rozsahu 95 stran je členěna do 8 hlavních kapitol a dále obsahuje abstrakt v českém a anglickém jazyce, grafy a tabulky v textu, seznam použitých zkratk a citovaných literárních pramenů. V textu je prezentováno 5 obrázků, 24 grafů a 11 tabulek. Vlastní práce je prezentována na 47 stranách. Seznam literatury tvoří dalších 10 stran.

Kapitola *Úvod* (32 stran) jasnou a srozumitelnou formou uvádí čtenáře do problematiky diabetu, úlohy monocytů a sledovaných markerů PRL, TLR2 a TLR4. Úvodní teoretickou část vhodně doplňují doprovodné obrázky. V kapitole 3 *Materiál* je zařazen popis vzorků, s nimiž autorka pracovala. Autorka zde pracuje s relativně malými počty vzorků v konkrétních vyšetřovaných skupinách (str. 36). Kapitola 4, *Materiál a metody*, je logicky a jasně členěná a srozumitelně popisuje použité metody. Nedostatkem v kapitole *Materiál a metody* je chybějící kapitola, resp. odstavec, kde by autorka objasnila vztah a způsob přepočtu mezi MFI a expresí proteinu při měření průtokovou cytometrií. Chybí tak logická souvislost, ze které vychází v dalších částech diplomové práce (v kapitole *Výsledky* píše autorka o intenzitě fluorescence, v kapitole *Diskuze* pak o fluorescenci a expresi a v kapitole *Závěr* popisuje již pouze expresi proteinu). Dále v metodách při hodnocení intenzity fluorescence postrádám informaci o izotypových kontrolách (FITC, APC) použitých v experimentech. Kapitola *Výsledky* je zpracována velmi čitelně a srozumitelně až na několik drobných detailů. Např. v grafech 21 a 22 (str. 71, 72) autorka neuvádí počet vzorků v analýze, také zde chybí informace o heterogenitě souboru (např. formou SD). V případě, že se jedná o ukázkou reprezentativního vzorku ze sledovaného souboru, toto je nutné v práci uvést. Kapitola *Diskuze* na osmi stranách velice vhodným způsobem hodnotí dosažené výsledky a srovnává je s publikovanými údaji. Autorka v kapitole *Závěr* shrnuje dosažené výsledky a v obecné rovině se pokouší o prokázání biologické souvislosti mezi naměřenými daty a diabetem, což lze hodnotit velice kladně. Nemohu však souhlasit s bodem č. 1, kde autorka píše, že na základě rozdílných hodnot exprese PRL, TLR2 a TLR4 mezi skupinou „buffy coatů zdravých dárců“ a „zdravých jedinců odebraných standardním

způsobem do systému Vacuette“ není vhodné „používat buffy coat jako zdravé kontroly“. Dle mého názoru experimenty v diplomové práci pouze dokazují, že při analýze exprese mRNA v rámci jedné studie není vhodné kombinovat biologický materiál připravený / ošetřený různým způsobem. Dále pak v bodě 3 se v souvislosti s chybějící informací o vztahu MFI a exprese proteinu v kapitole *Materiál a metody* jedná o ne zcela přesnou formulaci (MFI vs. exprese proteinu). *Seznam použité literatury* vychází převážně z aktuálních původních recenzovaných prací. Jeho zpracování je zcela jednotné. Jediným nedostatkem je citace práce Němečková I, 2012 (str. 91), kde není uveden kompletní zdroj.

Některé nedostatky v diplomové práci studentky Bc. Zinkové již byly zmíněny. Co se formální stránky a jazykové úrovně týče, nemám žádné výhrady. Práce je psána zajímavě a má logickou strukturu. Místo se v práci vyskytují drobné chyby a překlepy (str. 13 – DQA1*05:01-DQB1*02:01 není alela, ale haplotyp, navíc dle aktuální nomenklatury je správný zápis DQA1*05:01 a ne DQA1*0501; str. 25 – TLR3 namísto TL3; str. 37 – zřejmě 2010-2013 namísto 201-2013; atd....). Tyto drobné nedostatky však neovlivňují zásadním způsobem velmi dobrou úroveň práce.

Otázky týkající se samotného zpracování, resp. experimentálního provedení práce:

- 1) Proč autorka jako endogenní kontrolu při měření exprese mRNA zvolila právě gen PKG1? Proč nezvolila obvykle používané endogenní kontroly, jako např. B2M, TBP, GAPDH, 18S, atd. ...?
- 2) Jaký je význam izotypových kontrol a negativních kontrol při měření fluorescence proteinů na průtokovém cytometru?
- 3) Jakým způsobem/procesem jsou prezentovány autoantigeny (vlastní antigeny) na antigenech HLA II. třídy (str. 12)?

Při celkovém hodnocení práce lze konstatovat, že diplomová práce své vytčené cíle splnila. Výše uvedené nedostatky zřejmě souvisí s časovou tísňí při dokončování práce. Práci rozhodně doporučuji k obhajobě a navrhuji hodnocení velmi dobře.

V Praze dne 4.9.2013

RNDr. Peter Novota, Ph.D.