

Posudek na diplomovou práci Alžběty Zinkové

## ÚLOHA MONOCYTŮ A NESPECIFICKÉ IMUNITY V DIABETU

Katedra antropologie a genetiky člověka, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova v Praze  
Školitel: RNDr. Pavlína Čejková, Ph.D.

Předkládaná diplomová práce je součástí širšího projektu zabývajícího se významem mechanismů přirozeného imunitního systému včetně cytokinu prolaktinu v rozvoji či průběhu autoimunitních onemocnění se zvláštním důrazem na diabetes mellitus. Jedním z cílů projektu je objasnit funkci monocytů, jejich povrchových struktur a působků v patogenezi autoimunitního diabetes. Alžběta Zinková ve své diplomové práci navázala na pilotní studii zpracovanou v rámci předchozí diplomové práce v letech 2008 – 2010 na Katedře antropologie a genetiky člověka.

V průběhu řešení své diplomové práce se studentka seznámila, technicky zvládla a pro získání dat používala následující kroky a metody: sběr vzorků vytypovaných jedinců (periferní krev); imunomagnetickou separaci monocytů s následnou izolací RNA, její zpětnou transkripci a kvantifikaci cílových genů pomocí real-time PCR, zpracování dat, statistickou analýzu výsledků; ficoll-gradientovou separaci mononukleárních buněk, jejich *in vitro* kultivaci, stimulaci, analýzu exprese povrchových markerů pomocí fluorescenčně značených monoklonálních protilátek a průtokové cytometrie.

Diplomová práce obsahuje tři základní pilíře vedoucí k naplnění jejího cíle rozšíření znalosti o roli vrozené imunity a cirkulujících monocytů v patogenezi T1D:

- 1) Na základě povrchové exprese CD14 a TLR2 a TLR4 receptorů, a stanovením bezprostřední aktivace genů *CD14*, *TLR2*, *TLR4* a *PRL* (kvantifikací mRNA) porovnat aktivitu a posoudit funkci monocytů u pacientů s autoimunitním diabetem, diabetem 2. typu a zdravými jedinci
- 2) Ověřit, nakolik je buffy coat získaný z krevních odběrů dárců krve transfúzních odděleních vhodný pro použití jako srovnávací materiál reprezentující zdravou populaci (a tedy představující fyziologické hodnoty sledovaných parametrů). Diskutabilní jsou zejména podmínky odběru (typ odběrové nádoby, použité antikoagulační agens, změna *in vivo* poměrů buněčné vs. nebuněčné složky periferní krve, doba od odběru vzorku do jeho uvolnění transfúzní stanicí pro vědecké využití)
- 3) Optimalizovat metody *in vitro* kultivace a krátkodobé, popř. i dlouhodobé stimulace periferních monocytů pro potřeby studia vlivu exogenního prolaktinu na monocyty

Dílčí cíle práce, které si diplomantka předsevzala, byly splněny. Sledováním exprese CD14, TLR2 a TLR4 markerů u různých typů diabetu a zdravých jedinců bylo mj. odhaleno rozdílné zastoupení jednotlivých podtypů monocytů u diabetických pacientů ve srovnání s kontrolami, což naznačuje jistou míru deregulace imunitního systému u diagnózy diabetes

mellitus, která může primárně souviset s hyperglykemií. Diplomantka dále ověřila, že nelze použít vzorky buffy coatů zdravých dárců krve pro porovnání míry genové exprese ve vzorcích plné krve odebrané do vakuových zkumavek. V neposlední řadě se podařilo optimalizací *in vitro* experimentálních podmínek nastavit podmínky krátkodobých stimulací tak, aby bylo možné sledovat krátkodobý efekt stimulačních agens (LPS, PRL aj.) na monocytů. Pro úplnost, nikoliv jako výtku, je nutné zmínit, že doladění experimentálních podmínek pro sledování dlouhodobého vlivu studovaných agens (16 a více hodin) nebylo z časových důvodů dovedeno do konce.

Hodnocení Bc. Alžběty Zinkové: Přestože v prvním roce magisterského studia nebylo pracovní tempo Alžběty zcela optimální, postupně se solidně zapracovala a pracovala bezproblémově a samostatně. Ochotně a aktivně se podílela na náboru jedinců pro potřeby kontrolního souboru. Při samotné analýze dat aktivně přistupovala k hledání možných vysvětlení pro námi pozorované jevy. Jistou výtku mám k tvorbě textu diplomové práce, která probíhala v poslední možné chvíli. Přestože se některé experimenty ověřovaly ještě v průběhu letních měsíců a nebylo tak samozřejmě možné mít celý text připraven v dostatečném předstihu před odevzdáním, některé kapitoly mohly být zpracovány poměrně dlouho dopředu. Jsem přesvědčena, že autorka má potenciál k tomu vytvořit text o několik úrovní kvalitnější. Rovněž bych jako školitel uvítala, kdybych měla možnost před odevzdáním nahlédnout do finální verze diplomové práce a vyjádřit se k ní.

Cíle stanovené v diplomové práci byly splněny, získaná data posouvají výzkum projektu objasňujícího úlohu nespecifické imunity a monocytů v patogenezi autoimunitního diabetes a stanou se součástí připravované publikace. Výše uvedené výtky týkající se samotného zpracování práce a kvality textu však do jisté míry ovlivňují celkovou kvalitu práce. Diplomovou práci doporučuji k obhajobě s hodnocením velmi dobře.

V Praze dne 3. 9. 2013

RNDr. Pavlína Čejková  
školitel