

Oponentský posudek na diplomovou práci

Autor práce: Bc. Nikola Butalová

Název práce: Charakterizace imunitních buněk a sledování změn zánětlivých proteinů u miniprasečího modelu Huntingtonovy choroby

Magisterská práce Nikoly Butalové se věnuje aktuálnímu tématu Huntingtonovy choroby (HD), nevyléčitelného neurodegenerativního onemocnění lidí. Práce je součástí projektu, v rámci kterého byl vytvořen jedinečný zvířecí model pro studium Huntingtonovy choroby, transgenní prase exprimující mutovaný lidský huntingtin. Možnou praktickou aplikací tohoto modelu je hledání biomarkerů nástupu a progresu nemoci.

Cíle práce:

Cíle předložené práce zahrnovali zavedení metodiky pro izolaci a kultivaci prasečích monocytů a makrofágů, jejich následnou charakterizaci průtokovou cytometrií a sledování změn v koncentracích vybraných cytokinů v sekretu těchto buněk a v krevním séru. Posledním cílem byla charakterizace exprese mutovaného a endogenního huntingtinu v buňkách izolovaných z transgenních prasat.

Úvod:

V úvodu se autorka věnuje popisu Huntingtonovy choroby, jejích projevů a forem, neuropatogeneze, charakterizaci huntingtinu a jeho funkce, dále role imunitního systému a zánětu v patogenezi HD a v neposlední řadě popisu experimentálních modelů HD. Části pojednávající o HD jsou zpracovány pečlivě a jsou odrazem precizní literární rešerše. Část věnující se imunitnímu systému je zpočátku pojata příliš zešíroka a obecně bez citací, naštěstí v dalších podkapitolách je rozvedena detailněji, včetně citací týkajících se role jednotlivých imunitních buněk a molekul v zánětu nervového systému a v patogenezi HD. Pro lepší srozumitelnost je úvod doplněn 2 obrázky a jednou tabulkou.

Materiál a metodika:

V práci studentka využívala celou řadu pokročilých imunologických metod (průtoková cytometrie, MACS, Luminex assay, Western blotting), které jsou popsány srozumitelně a dostatečně detailně. Popis použitých metod je doplněn 6 obrázky,

kteře názorně ilustrují design experimentu, praktické provedení jednotlivých technik, nebo způsob analýzy dat. Použité protilátky jsou přehledně zobrazeny v tabulkách. Je škoda, že autorka nevyužila potenciál průtokové cytometrie v oblasti mnohoparametrické analýzy a omezila genotypickou charakterizaci na jednobarevné (maximálně dvoubarevné) analýzy. Pravděpodobně je to dáno nedostatečnou dostupností fluorescenčně značených protilátek proti molekulám prasete.

Výsledky:

V kapitole výsledky autorka prezentuje 35 obrázků a 2 tabulky. Prezentované výsledky jsou zajímavé a obsahují velké množství informací, avšak popis výsledků v textu i v legendách by mohl být precizněji a srozumitelněji formulován, zejména s ohledem na pozorované statisticky významné rozdíly mezi TG a WT zvířaty. P-hodnoty jsou uváděny výhradně pro srovnání nestimulovaných a stimulovaných vzorků, přičemž pro závěry práce je důležitější správné posouzení rozdílů mezi TG a WT prasaty a tyto jsou zpravidla jen zmíněny v legendě, ale bez uvedení P-hodnot. To pokládám za závažný nedostatek, který brání kritickému posouzení dosažených výsledků. Uvítal bych nějaké shrnutí srovnání TG a WT formou tabulky, která by obsahovala pro všechny měřené cytokiny základní statistické parametry. Část věnovaná charakterizaci izolovaných buněk průtokovou cytometrií prezentuje jen výsledek jednoho měření, není možno posoudit reprodučibilitu, variabilitu mezi jedinci, příp. rozdíly mezi TG a WT zvířaty. Pro lepší posouzení fenotypu buněk by bylo vhodné využít kombinace více znaků ve vícebarevném panelu.

Diskuse:

Kapitola diskuse se zaměřuje především na srovnávání vlastních výsledků s předchozími výsledky získanými u mladších prasat ve stejném modelu. Pro lepší přehlednost by bylo vhodné rozdíly mezi citovanými výsledky u 36-měsíčních prasat a novými výsledky u 48- až 56-měsíčních prasat shrnout formou tabulky. Diskuse se poměrně málo věnuje kritickému zhodnocení použitého modelu, zvolených metod a dosažených výsledků.

Formální a jazyková stránka:

Po formální a jazykové stránce je práce zpracována kvalitně, jen s pár překlepy a některými ne zcela zdařenými předklady z angličtiny (např. místo kaudate nukleus

bych doporučil správné anatomické termíny latinsky *nucleus caudatus*, příp. česky ocasaté jádro).

Připomínky a otázky do diskuse:

1. Prasata exprimující lidský mutovaný huntingtin představují jedinečný experimentální model. Byly u TG zvířat pozorovány nějaké klinické příznaky nebo patologické změny patognomické pro Huntingtonovu chorobu?
2. V čem vidíte nejvýraznější rozdíl mezi výsledky popisovanými u 36-měsíčních TG prasat a Vámi pozorovanými změnami u starších jedinců?
3. Některé stanovované cytokiny pokládáte za potenciální biomarkery pro HD. Co je ještě podle Vás třeba udělat, aby se tyto parametry daly jako biomarkery použít?
4. U některých cytokinů popisujete statisticky významné rozdíly mezi TG a WT zvířaty. Jsou tyto rozdíly srovnatelné s rozdíly mezi zdravými lidmi a pacienty s HD popsáním v literatuře?
5. Tato práce položila dobrý metodický základ pro další charakterizaci monocytů a makrofágů u prasat s HD. Kdybyste měla možnost v této práci pokračovat, jaké vlastnosti těchto buněk by Vás zajímaly a jakými metodami byste je chtěla zkoumat?
6. Myslíte, že existuje přímá souvislost mezi expresí mutovaného huntingtinu v buňkách imunitního systému a pozorovanými změnami? Jakým experimentálním přístupem byste to mohla zjistit?

Závěr:

Předložená práce splňuje formální a obsahové požadavky. Práce splnila cíle, které si autorka vytyčila. I přes zmiňované nedostatky v interpretaci výsledků práci doporučuji k obhajobě.

V Praze, dne 8.9.2017

MVDr. Jozef Janda, PhD.