Ústav
experimentální
medicíny AV ČR, v.v.i.
EU Centre of Excellence

Oponentský posudek na diplomovou práci Bc. Halyny Pidhorodetské nazvanou „Modulace chemokinového profilu lidských makrofágů a renálního epitelu“

Halyna Pidhorodetská předložila diplomovou práci, jejímiž hlavními cíli bylo stanovit účinek prozánětlivého cytokinu TNF-α na produkci 5 vybraných chemokinů u buněčných linií adenokarcinomu, epiteliálních buněk renálních proximálních tubulů a monocytární linie THP-1. Druhým cílem pak bylo stanovení sérových hladin vybraných chemokinů ve vzorcích odebraných před transplantací a dále 1, 2, 3 týdny a 1, 2, 3, 6 a 12 měsíců po transplantaci ledviny.

Práce je klasicky členěna a obsahuje abstrakt v českém a anglickém jazyce, seznam zkratek, literární přehled, vytyčení cílů práce, popis použitého materiálu a metodik, výsledky, diskuzi, závěr a přehled použité literatury. Mimoto práce obsahuje i kapitolu popisující principy použitých metod, kterou považuji spíše za nadbytečnou.

Při psaní literárního přehledu a diskuze autorka použila celkem 57 zdrojů, které zahrnovaly 6 knih, 25 přehledných článků, 25 původních článků a článek Bergese et al., který v seznamu literatury chybí. Problém vidím především ve frekventovaném používání přehledných článků a knih, z nichž jsou občas převzaty poměrně rozsáhlé pasáže, které nezřídka tvoří i celou kapitolu (kapitola 2.1, 3, 5, 5.1, 5.2.1, 5.2.2, 6, 6.1). Literární úvod navíc místy působí obecně či učebnicově a postrádám v něm kapitoly obsahově bližší náplni diplomové práce (například kapitolu věnovanou vlivu různých prozánětlivých cytokinů na produkci chemokinů nebo kapitolu shrnující výsledky studií monitorujících koncentrace prozánětlivých cytokinů nebo chemokinů v sérech pacientů po transplantaci). Formální stránka práce je průměrná, přičemž autorka se na řadě míst nevyhnula přejímání anglického slovosledu či používání některých méně vědeckých termínů.

Kapitola materiál a metody místy zabíhá do zbytečných podrobností v postupu, a to především v kapitolách týkajících se práce s tkáňovými kulturami (například popis postupu rozmražení a kultivace jednotlivých linií nebo schémata kultivačních destiček pro každou linii). Na druhou stranu v této kapitole chybí zásadní informace zajišťující případnou zopakovatelnost experimentů (například zdroj buněčných linií, výrobce použitých kultivačních médií a suplementů a použitého plastiku). Zároveň autorka zcela opomenula uvést metodiku ke značení protilátkou proti molekule CD54 pro průtokovou cytometrii.

Experimentální část práce obsahuje celkem 20 grafů a 20 doprovodných tabulek a dělí se na 2 části, v nichž byla metodou Luminex stanovována koncentrace chemokinů IL-8, ENA-78, MCP-1, MIP-1β a RANTES v supernatantech z kultur buněčných linií stimulovaných TNF-α nebo v sérech pacientů po transplantaci ledviny. V případě výsledků z průtokové cytometrie by bylo vhodné ukázat kromě sloupcových grafů i reprezentativní dot ploty dokumentující gatovací strategii. Ve výsledkové části rovněž postrádám souvislejší text, který by tvořil úvod nebo komentář k jednotlivým souborům výsledků (z toho důvodu ve výsledkové části zcela chybí odkazy na grafy a tabulky v textu, protože je autorka neměla kam včlenit).

Diskuze a závěr bohužel představují stylisticky nejslabší část diplomové práce obsahující řadu špatně formulovaných nebo těžko pochopitelných vět. Další problém vidím i v tom, že získané výsledky nejsou řádně diskutovány – autorka se omezila pouze na popsání výsledku, které doplnila vybranými fakty, týkajícími se daného chemokinu, která jsou navíc nezřídka přejata z přehledného článku nebo knihy. Chybí zde porovnání výsledků s relevantními původními studiemi či zamyšlení se nad širšími souvislostmi.

K práci mám následující dotazy:

- V práci jste sledovala sérové hladiny chemokinů u celkem 53 pacientů po transplantaci ledviny. Chci se zeptat, zda u některého z pacientů došlo po dobu sledování a odběrů k odhojení transplantátu, a pokud ano, zda jste jeho hodnoty zkusila vyčlenit a porovnat se zbytkem kohorty?
- U některých pacientů jste naměřila extrémní hodnoty v produkci některých chemokinů. Zkoušela jste porovnat, zda tyto extrémní hodnoty pocházely od jednoho (či více v případě více extrémů) pacienta, a to jak v průběhu času, tak i napříč měřenými chemokiny?
- V práci postrádám alespoň krátký komentář k tomu, co obnáší jednotlivé typy léčby (bez indukce a Simulect) použité při léčbě transplantovaných pacientů. Co ovlivňuje to, který pacient dostane jaký typ léčby?
- Dále se chci zeptat, na základě jakých kritérií jste vybrala právě těchto 5 testovaných chemokinů a zda jste například neuvažovala o zařazení testování sérových hladin TNF-α nebo jiného prozánětlivého cytokinu, což by představovalo hezké propojení s *in vitro* částí experimentů v diplomové práci?
- V *in vitro* části porovnáváte produkce chemokinů u 3 různých buněčných linií – je toto porovnání relevantní, když pravděpodobně nemáte v pokusu na počátku stejné počty buněk? V případě THP-1 se jedná o 2 miliony, v případě zbylých 2 linií hovoříte pouze o narostlé vrstvě buněk.

- V jakých jednotkách je osa y u výsledků z průtokové cytometrie? Proč jste si pro analýzu vybrala právě molekulu CD54? Napadají vás některé další molekuly, které byste v této souvislosti ještě mohla měřit?

K práci mám následující připomínky:

- Název práce ne zcela odpovídá její náplni a opomíjí část týkající testování sérových hladin chemokinů.
- Poznámku mám k zavádění zkratek, které jsou místy zaváděny nejednotně, opakovaně nebo zbytečně pro výraz, který se v práci vyskytuje pouze jednou (TCMR, GaGs, FDC).
- Na straně 14 chybně řadíte komplement k adaptivní imunitě.
- Dlouhá a krátká pomlčka je místy používána chybně (například MIP – 1β, TNF – α, SDF – 1 v seznamu zkratek nebo DCs-dendritic cells na str. 13) a názvy s řeckými písmeny (IFN-γ/gamma, GRO alpha/α) jsou používány nejednotně.
- Překlepy (zasadní (str. 12), endritic cells (str. 13), inflamazomu (str. 14), o ischemii a jejím škodlivým vlivům (str. 17), zaměřena (str. 26), monocystickou leukémií (str. 34), jedním (str. 34), cash buffer (str. 36), disent RD5K (str. 36), nepipetovaly (str. 37), Ze všech druhů chemokinů se vykazuje MIP-1 β nejnižší rozdíly (str. 55), imunoneutraliazci (str. 67), vyšetřeních (str. 68), arterosklerózy (str. 68)).
- Problematické formulace: Ovšem stěžejní překážka je v tom, že klinický scénář je oproti in vitro terénu značně redundantní (str. 15), hostitelské protilátky (str. 19), Chemotaxi vykonává za pomoci svých specifických chemokinových receptorů (o IL-8, str. 24), Dále byla dokázána korelace mezi zastavenou tvorbou (silencing) GRO-alpha s interleukinem-6 (IL-6), IL-8 a vaskulárním růstovým faktorem sekrece v obou typech testovaných buněk (str. 69).
- V textu chybí odkaz na obrázek 1 a obrázek 4.
- Legenda ke grafům 11, 12, 14, 15, 18 a 19 obsahuje chybné miniatury pro označení odlehlých a extrémních hodnot.
- Seznam literatury není v jednotném formátu.

I přes řadu výše zmíněných nedostatků práci doporučuji k obhajobě a hodnotím ji stupněm dobře.

V Praze dne 24. 1. 2018 Mgr. Eliška Javorková, Ph.D.