

MIKROBIOLOGICKÝ ÚSTAV AV ČR, v.v.i.



Sektor imunologie a gnotobiologie

Ved.: prof. RNDr. Blanka Říhová, DrSc.

Videňská 1083

142 20 Praha 4

Oponentský posudek diplomové práce Kazi Svobodové: „Imunitní mechanismy v patogenezi parodontitidy“

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra Fyziologie živočichů a vývojové biologie

Diplomová práce Kazi Svobodové „Imunitní mechanismy v patogenezi parodontitidy“ byla vypracována pod odborným vedením RNDr. Jiřiny Bártové, CSc, na Výzkumném ústavu stomatologickém v Praze a ve spolupráci s HLA laboratoří IKEM. Analýzu genových polymorfismů provedl Ústav patofyziologie MU v Brně. Práce navazuje a rozvíjí tematiku vztahu parodontitidy a imunitních mechanismů, která je v laboratoři školitelky studována již řadu let.

Text má obvyklé členění, je uveden abstraktem v češtině i v angličtině, cíl práce je formulován ve stručném úvodu. Literární přehled na zhruba 30 stranách podává přehled publikovaných údajů o parodontitidě, typech, patogenezi a etiologii onemocnění, uvádí rizikové faktory vzniku nemoci a imunitní mechanismy s ní spojené. Následuje poměrně rozsáhlá a podrobná metodická část, výsledky jsou shrnuty ve formě přehledných grafů, ale je připojena i příloha s přesnými výsledky měření jednotlivých cytokinů, a to pro všechny pacienty. Dále je zařazena diskuse, závěr, seznam literatury uvádí 83 citace. Pro čtenáře je příjemné rozčlenění textu pomocí barevných stran na začátku kapitol.

Předložená práce je součástí projektu, který chce studovat polymorfismy v genech pro cytokiny a faktory ovlivňující vznik a průběh zánětu, a objevit vztah těchto polymorfismů k regulaci imunitní odpovědi a ke klinickému stavu parodontu. To je jedna z cest k vymezení rizikových faktorů vzniku parodontitidy, a poznatky by měly zlepšit možnosti, jaké má nyní stomatologie k určení rizikových faktorů vzniku parodontitidy, vyhledání osob se zvýšeným rizikem onemocnění, a hledání preventivních postupů, jak onemocnění předcházet nebo jej léčebně ovlivnit ještě v průběhu počátečních stádií. Tato problematika je velmi aktuální.

Druhým, a nikoli malým, cílem diplomové práce bylo zavést na pracovišti novou metodu stanovení koncentrace vybraných cytokinů metodou LUMINEX.

Autorce této práce se podařilo metodu na pracoviště zavést a využít, a to je třeba hodnotit velmi kladně. Každý laboratorní pracovník ví, jak může být komplikované pracovat se zcela novou metodou, bez ohledu na to, že je k dispozici komerčně dostupný materiál. LUMINEX je relativně nově používaný postup, s nímž má nyní u nás zkušenosti jen málo laboratoří. Autorka také upozornila na některá úskalí provedení této metody, která se jí podařilo odhalit a překonat. Velmi vhodně je do kapitoly Materiál a metody zařazena část firemních materiálů, a ukázka výsledků z analytického zpracování dat ve výsledkové části.

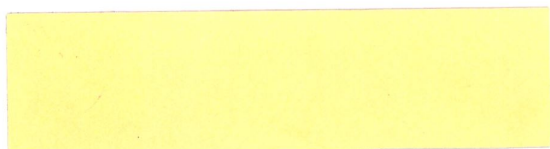
Na souboru 15 pacientů s parodontitidou byla testována produkce cytokinů, které mají vztah k zánětu parodontu, po stimulaci mononukleárních buněk z periferní krve *in vitro*, s použitím panelu mitogenů a antigenů. Jak spektrum cytokinů, tak stimulující agens byla vybrána na základě předchozích výsledků a zkušeností pracoviště VÚS. Výsledky korelace produkce cytokinů s vybranými polymorfismy v genech pro několik cytokinů odhalily nebo alespoň naznačují některé závislosti. To je vynikající výsledek, který by snad byl vhodný k publikování alespoň formou krátkého sdělení. Rozhodně však je velmi podstatným základem pilotní studie, kterou chce pracoviště ještě rozšířit a dokončit. Pro zkompletování takové studie by bylo potřeba vedle souboru pacientů zahrnout i zdravé osoby. V souboru pacientů zahrnutých do diplomové práce kontrolní skupina sice chybí, ale autorka je si tohoto omezení vědoma a v diskusi to také uvádí. Relativně malý počet osob a absence kontrolní skupiny zdravých osob nesnižuje za těchto okolností kvalitu celé práce. Tato diplomová práce má bohužel také některé nedostatky spíše formálního charakteru, a na čtenáře tak může působit dojmem určité nervozity při zpracování. V každém textu podobného rozsahu se objeví překlepy – zde jsou však poměrně četné. Na některých místech jsou komplikované formulace, obtížně srozumitelné při prvním čtení – např. hned 2. odstavec v souhrnu. Ve výsledkové části jsou v legendách obrázků obráceně popsány osy, např. u IL-5 (výsledky, str. 63) se neshodují údaje v grafu s popisem, na str. 22 záměna myši kontrolovaných (to bývají v pokusu všechny) za kontrolní... „Méně pečlivé“ formulace či opominutí tak místy vyústily v téměř matoucí sdělení – např. na str. 22 ... u pacientů s parodontitidou je 20 – 25% riziko vzniku myokardu ... a 17% riziko vzniku mozkové příhody.. Má zřejmě znamenat: riziko vzniku infarktu myokardu o 20 – 25 % vyšší a o 17 % vyšší...?

Navrhuji, aby se diplomantka při obhajobě případně vyjádřila k těmto otázkám:

1. Proč jste zvolili odběr vzorků supernatantů právě 3. a 6. den po stimulaci? Je známo, některé cytokiny jsou tvořeny poměrně rychle po stimulaci buněk, velmi obvyklý čas je 24 hod (+ případně i delší interval) po stimulaci.
2. Mělo by podle Vašeho názoru smysl současně detekovat i proliferaci buněk po stimulaci?
3. Korelovali jste výsledky stanovení cytokinů pomocí metody Luminex také s výsledky stanovení jinou metodou, např. s běžně používanou ELISOU? Je samozřejmé, že provádět veškerá stanovení *de facto* dvakrát by bylo neúměrně nákladné vzhledem k ceně detekčních souprav, pracné a pravděpodobně nemožné vzhledem k zátěži pacientů, ale pokud máte alespoň některé výsledky k dispozici pro porovnání, prosím, komentujte.

Závěr: Předložená diplomová práce beze zbytku splnila vytčené cíle: uchazečka zavedla novou metodu stanovení cytokinů v malém vzorku supernatantu, a provedla korelaci produkce cytokinů s výsledky detekce vybraných genových polymorfismů genů pro některé cytokiny. Získala tak výsledky, které by mohly být buď přímo publikovány, nebo se mohou stát podstatnou součástí připravované pilotní studie. Mají charakter prioritních výsledků v příslušném oboru. Chyby, které jsem práci vytkla, považuji za chyby formálního charakteru.

V Praze, 17.9.2007



RNDr. Milada Šírová

Mikrobiologický ústav AVČR, v.v.i.