



UNIVERZITA KARLOVA  
I. lékařská fakulta

## Oponentský posudek na diplomovou práci Bc. Nikoly Kormundové

V předložené diplomové práci nazvané „Metody detekce snížení imunitní odpovědi u pacientů po kardiochirurgické operaci“ se autorka věnuje charakterizaci prozánětlivé imunitní odpovědi u pacientů po kardiochirurgické operaci.

Diplomová práce má standardní členění zahrnující seznam zkratek, úvod, literární přehled, vlastní experimentální část s cíli práce, použitými metodami a reagensy, výsledky. Následuje diskuze, závěr a seznam použité literatury. Diplomová práce je zpracována čitelně a přehledně, jednotlivé oddíly na sebe plynule navazují. Nicméně mně přijde zbytečný pododdíl 1.2.3. Tumor nekrotizující faktor alfa (TNF- $\alpha$ ) v literárním přehledu, když následuje část věnovaná cytokinům 1.4. Cytokiny spojené s CPB. Seznam zkratek by si zasloužil pečlivější zpracování. Zejména by bylo vhodné sjednotit formu psaní velkých písmen v seznamu zkratek (např. CD – cluster Designation x ERK – Extracellular Signal-Regulated Kinase x HEK – human embryonic kidney x GM-CSF – granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor). Zkratky by měly být vysvětleny i ve vlastním textu práce tam, kde se poprvé objeví (ne pouze v seznamu zkratek – např. APC, str. 20; PAMP – str. 24; DISC – str. 25). Některé zkratky nejsou vysvětleny vůbec (např. EDTA, FBS, PBS). Osobně se přikláním k používání širšího termínu MAMP (microbe associated molecular patterns) místo PAMP v kontextu rozpoznávání molekulárních struktur mikroorganismů receptory přirozené imunity (nejenom patogenní mikroorganismy mají molekulární struktury rozpoznávané imunitním systémem).

Velmi oceňuji praktické zaměření diplomové práce s jasným dopadem do klinické praxe. Autorka si osvojila široké spektrum experimentálních přístupů zahrnujících separaci jednotlivých buněčných populací, kultivaci buněk *in vitro* a stanovení tvorby IFN- $\gamma$  různými metodickými přístupy. V případě stanovení jednotlivých populací pomocí průtokové cytometrie postrádám ukázkou analýzy buněk (tzv. gatovací strategii) včetně detailnějšího popisu přípravy vzorků a adekvátních kontrol pro vlastní vyhodnocení naměřených dat.

Práci hodnotím jako velmi zdařilou a jednoznačně ji doporučuji k obhajobě.

### **Na autorku mám následující otázky:**

V oddíle výsledky uvádíte, že od stanovení produkce IFN- $\gamma$  metodou ELISA bylo upuštěno z důvodu snížení reproducibility dat mezi esejemi jednotlivých lotů při opakovaném měření. Mám tomu rozumět tak, že stanovení vzorků pomocí reagensí (navazovací a biotinylovaná protilátka) z různých šarží vedlo k odlišným výsledkům při měření stejných vzorků? Jaká byla variabilita sekrece IFN- $\gamma$  mezi jednotlivými měřeními u zdravých kontrol?

Zkoušeli jste porovnat hodnoty IFN- $\gamma$  po stimulaci CD3 a kombinaci CD3 s CD28 se současným přidáním IL-2?

V případě stanovení IFN- $\gamma$  metodou ELISA píšete, že destičky byly inkubovány po přidání substrátu ve tmě dle potřeby. Jak tomu mám rozumět? Můžete lépe popsat, kdy nastal okamžik pro přidání kyseliny sírové k zastavení reakce?

Opravdu byla mononukleární frakce leukocytů získána centrifugací s využitím separačního media Lymphoprep při 800g s následným promytím při 400g (str. 38)?

Při stanovení IFN- $\gamma$  pomocí průtokové cytometrie, jak uvádíte na str. 41, postrádám informaci, zda byl použit inhibitor extracelulárního transportu a reagentie pro intracelulární stanovení cytokinů?

Výsledky prezentované na Grafu 3 a Grafu 4 poukazují na pokles monocytů a lymfocytů. Předpokládám, že se jedná o procenta monocytů a lymfocytů z celkových CD45+ pozitivních buněk (či celkových událostí). Pokud došlo k poklesu monocytů a lymfocytů z celkových CD45+ buněk, u jaké populace došlo k nárůstu? V diskuzi odkazujete na práci Bayer a kol., 2009, kteří popsali absolutní pokles počtu lymfocytů. Na základě jakých znaků byly stanoveny lymfocyty ve Vaší práci (graf 4)? Kde by se na dot plotu dle FS a SS nacházely NK a plasmacytoidní dendritické buňky?

Proč nebyl stanoven IFN- $\gamma$  u pacientů po kardiokirurgické operaci pomocí reportérových buněk HEK293?