

Posudek na diplomovou práci Veroniky Slukové

## ÚLOHA TOLL-LIKE RECEPTORŮ A STRESOVÉHO HORMONU PROLAKTIN V PORUCHÁCH IMUNITNÍHO SYSTÉMU

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 cytokínu prolaktinu a mechanismů přirozeného imunitního systému v rozvoji či průběhu autoimunitních onemocnění se zvláštním důrazem na diabetes mellitus (T1D a LADA). Cílem diplomové práce bylo:

1) stanovit fyziologické hladiny PRL mRNA exprese v monocytech periferní krve, klíčových buňkách přirozené imunity, a ty porovnat s mírou exprese *PRL* genu u nemocných T1D nebo LADA diabetem (jako autoimunitní typy diabetu) a T2D coby diabetem s odlišnou etiologií vzniku;

2) určit vliv funkčního -1149 G/T SNP lokalizovaného v periferním promotoru *PRL* genu na míru exprese PRL mRNA;

3) změřit fyziologické hladiny exprese Toll-like receptorů TLR2 a TLR4, které jsou významnou součástí mechanismů přirozené imunity, a to na úrovni mRNA i proteinu, a porovnat je s mírou exprese u sledovaných skupin pacientů a zjistit tak, zda se Toll-like receptory mohou účastnit autoimunitních procesů;

4) s ohledem na zjištěné přispět k diskuzi o klasifikaci a diagnostice dvou podtypů autoimunitního diabetes, T1D a LADA.

Diplomová práce sestávala z následujících metodických kroků: sběr vzorků vytypovaných jedinců (periferní krev); izolace DNA s následnou typizací pomocí PCR-RFLP metody; imunomagnetická separace monocytů s následnou izolací RNA, její zpětnou transkripci a kvantifikaci cílových genů pomocí real-time PCR; separace mononukleárních buněk z krve pomocí ficoll-gradientové centrifugace, značení povrchových antigenů pomocí fluorescenčně značenými protilátkami a jejich detekce pomocí průtokové cytometrie. Na všech těchto krocích se diplomantka aktivně podílela, metodicky je zvládla a v práci prezentovaná data sama získala vyjma genotypizace kontrolního souboru zdravých jedinců, která byla provedena již v minulosti z nutnosti potřeby těchto dat pro ostatní části projektu (což je ovšem vzhledem ke všem dalším metodám a úkonům provedeným v této DP zanedbatelná položka). Studentka pracovala samostatně, rychle (někdy bohužel až zbrkle), občas chyběla 100%ní pozornost. Ocenit však musím chuť řešit zádrhele a to zejména v souvislosti s akvizicí a analýzou dat z průtokové cytometrie pomocí CellQuest software, a po zaučení samostatnost v činnostech mající vztah k matematice a statistice. Vyzdvihla bych ráda také část týkající se sběru samotných vzorků, kdy bohužel není možné v klinické studii naplánovat a soustředit odběry od větší skupiny pacientů organizovaně a najednou, proto bylo nutné ustanovit jakési služby na každý pracovní den, při nichž se dvě studentky střídaly.

Jedině díky zavedení tohoto systému a nutnému nasazení studentek bylo možné tuto studii technicky a organizačně provést.

Poněkud mě však zklamal přístup k samotnému zpracování dat a především sepsování diplomové práce. Přestože laboratorní data měla diplomantka změřená již v září 2010 a první statistické výstupy již v listopadu 2010, první manuskript spatřil světlo světa až po opakovaných výzvách v květnu 2011. Také komunikace ve finále sepsování nebyla ideální a jsem přesvědčena, že dosti kvalitní data mohla být zpracována a prezentována v diplomové práci o poznání lépe. Zejména v závěrečných částech diplomové práce je patrný autorčin spěch, který se podepsal nejvíce na oddíle Diskuze, jenž by si rozhodně zasloužil více rozpracovat.

Cíle stanovené v diplomové práci byly v celém rozsahu splněny. Získaná data poslouží jako základ pro připravovanou publikaci a budou použita jako výchozí v dalších částech projektu objasňujícího úlohu PRL a nespecifické imunity v patogenezi autoimunitních chorob.

Předkládaná diplomová práce splňuje veškeré požadavky na diplomové práce kladené, přes uvedené výtky přináší množství nových výsledků a je zpracována na dobré úrovni. Práci proto doporučuji k obhajobě a navrhuji hodnocení velmi dobře.

V Praze dne 14.9.2011

RNDr. Pavlína Čejková  
školitel