

## POSUDEK DIPLOMOVÉ PRÁCE

Název diplomové práce:

*Význam proteinů tepelného šoku v diagnostice a prognostice těhotenských komplikací*

Autor:

*Bc. Lenka Dvořáková*

Školitel:

*Prof. RNDr. Ilona Hromadníková, Ph. D.*

Oponent:

*RNDr. Šárka Růžičková, Ph. D., Biotechnologický ústav AV ČR, v. v. i.*

### Posudek:

Základním cílem práce bylo analyzovat expresi genů pro vybrané proteiny tepelného šoku (heat shock proteiny, Hsp) na úrovni mRNA u pacientek s těhotenskými komplikacemi (preeklamsií – PE, fetální růstovou retardací – FGR a gestační hypertenzí – GH).

Expres Hsp genů byla studována ve vzorcích placentární tkáně a periferní krve (PT a PK, respektive) pomocí reverzní transkripční polymerázové reakce v reálném čase (qRT-PCR), která byla provedena rovněž na referenčním souboru PT a PK odebraných ženám s fyziologickým průběhem těhotenství.

Ke statistickému vyhodnocení a kvantifikaci mRNA exprese Hsp genů byl použita analýza rozptylu s Bonferoniho korekcí a Spearmanův korelační koeficient.

Bylo zjištěno signifikantní zvýšení exprese Hsp27 a Hsp90 u pacientek trpících čistou preeklamsií nebo v kombinaci s fetální růstovou retardací.

Expres HspBP1 byla zvýšená ve skupině žen s mírnou preeklamsií ve srovnání s ženami s preeklamsií závažnou, a dále slabou negativní korelaci u HspBP1 a indexu pulsality v arteria umbilicalis.

Hsp60 byl více exprimován ve skupině PE+/-FGR, a zvýšení Hsp70 spolu se snížením produkce Hsp90 bylo pozorováno ve všech sledovaných skupinách.

U pacientek s oligo-/anhydramnií ve srovnání s ženami s normálním množstvím plodové vody byla exprese Hsp60 zvýšená a mezi expresí Hsp27, HspBP1 a indexem pulsality v arteria cerebri media byly nalezeny slabé negativní korelace.

Práce je psána v českém jazyce, v celkovém rozsahu 94 stran. Je členěna do 13 kapitol zahrnujících úvod a literární přehled, cíle, materiál a metody, výsledky, diskusi, závěr a citovanou literaturu (celkem 93 citací včetně recentních), doplněné přílohou s grafy.

Jazykové zpracování a prezentace jsou na velmi dobré úrovni, práce obsahuje minimum překlepů.

Autorka během řešení diplomové práce zvládla metodu izolace celkové RNA z PT a PK, syntézu cDNA, PCR v reálném čase a statistickou analýzu dat.

Komentáře a otázky:

*Formální stránka diplomové práce:*

- 1) K formální stránce mám poznámku týkající se logistiky základního členění diplomové práce. Nerozumím rozdělení prvních šesti kapitol, které by podle mne měly patřit do kapitoly 1. *Úvod*, následně rozdělené do podkapitol *1.2 Proteiny tepelného šoku*, *1.3 Hypertenzní poruchy ...*, *1.4 Fetální růstová retardace*, *1.5 Exprese Hsp během těhotenství* atd.
- 2) V úvodních kapitolách postrádám samostatný odstavec věnovaný proteinu HspBP1 (je zahrnut v textu kapitoly 2.3.5, ale měl by být pro lepší orientaci uveden odděleně) a u některých Hsp není jasné, zda jsou exprimovány konstitutivně nebo jsou inducibilní, což je jistě známo.
- 3) Rovněž chybí zdůvodnění, proč byly vybrány uvedené proteiny Hsp27, Hsp60, Hsp70, Hsp90 a HspBP1, což považuji za důležité.
- 4) Kapitola *6 Kvantifikace hsp genové exprese pomocí RT-PCR v reálném čase* na str. 35 je v podstatě zdvojnásobena v kapitole *Materiál a metody*, což je podle mne zbytečné.
- 5) V tomto kontextu rovněž postrádám zmínku o prováděné optimalizaci qPCR a Ct křivek v kapitole *Výsledky*, protože je nepravděpodobné, že by tato technologie správně fungovala hned od jejího prvního provedení.
- 6) Dále je nepřipustný termín “konstituční” exprese, neboť se jedná o “konstitutivní” expresi, jež nemá s “ústavností” nic společného (opačnou alternativou ke zmíněnému termínu je “fakultativní” nebo “indukovaná” exprese).

*Otázky k diplomové práci:*

- 1) V práci je uvedeno, že k analýze byly použity vzorky placentární tkáně a periferní krve, aby bylo možno se vyjádřit k systémové odpovědi matky na patologickou situaci. Počty odebraných vzorků PT a PK v podskupinách se neshodují, jedná se tedy o párové vzorky? Pokud ano, v kolika případech byla současně s placentou odebrána také periferní krev. Z hlediska posouzení systémové odpovědi na lokální patologický stav je takový postup přímo kritický.
- 2) S tím souvisí další otázka: v lednu tohoto roku vyšel článek od Akrema Abdulsida v *Plos One* 8 (1): e54540 o tom, že výsledek je výrazně ovlivněn tím, z jaké oblasti placenty je biopsie odebrána. Bylo by dobré v Diskusi tento fakt zmínit, protože zejména zjištěné slabé korelace by tím mohly být způsobeny. Zajímavé by bylo také porovnání výsledků diplomové práce s těmi, které jsou uvedeny v této publikaci.
- 3) Primery pro jednotlivé qPCR reakce jste navrhovali přímo sami nebo jsou převzaty z literatury?
- 4) Kolik mRNA, respective cDNA bylo použito na jednu reakci?
- 5) Hsp protein jsou často produkovány jako reakce organismu na zánět. Z práce jsem nabyla dojmu, že existuje představa, že exprese Hsp je spíše příčinou těhotenských komplikací. Plod

je svým způsobem vlastně semialogenní štěp, není produkce Hsp spíše důsledkem toho, že v organismu matky dojde k deregulaci tolerogenních mechanismů a Hsp jsou potom důsledkem “odhojování” jakoby cizorodé tkáně.

Předloženou diplomovou práci vzhledem k výše uvedenému komentáři doporučuji k obhajobě s ohodnocením dobré.

Praha 6. 9. 2013

RNDr. Šárka Růžičková, Ph. D.