

## Oponentský posudok na diplomovú prácu

**Meno posudzovateľa:** Mgr. Valéria Grobárová, Ph.D.

**Autor:** Bc. Miroslava Gorelová

**Názov práce:** Imunitná odpoveď jednotlivých subpopulácií dendritických buniek na probiotický kmeň *E. coli* O83:K24:H31

**Ciele práce:** Ciele práce sú rozdelené do 3 bodov:

- 1) Charakterizácia vplyvu *E. coli* O83:K24:H31 na maturáciu mDC/pDC novorodencov zdravých a alergických matiek,
- 2) porovnanie produkcie cytokínov po stimulácii *E. coli* O83 u mDC novorodencov zdravých a alergických matiek,
- 3) rozdiel v indukcii subpopulácií (Th1, Th2, Th17 a Treg) po kokultivácii naivných CD4<sup>+</sup> T-lymfocytov s mDC/pDC stimulovaných *E. coli* O83 novorodencov zdravých a alergických matiek.

### Štruktúra (členenie práce):

Členenie práce je štandardné. Rozsah práce: 78 strán vlastného textu. Súčasťou práce je aj kapitola Príloha, kde je uvedený zoznam katalógových čísiel protilátok, niektorých roztokov a reagensí a taktiež gatovacia stratégia k vyhodnocovaniu pokusov.

### Literárny prehľad:

Literárny prehľad je rozdelený na 2 hlavné kapitoly a to: 1) Alergia a mikrobiota u človeka, 2) Dendritické bunky.

Autorka do určitej miery vzala ohľad na pripomienky v predošlom posudku a rozšírila kapitolu týkajúcu sa alergií a doplnila nové kapitoly o zapojení rôznych subpopulácií T-lymfocytov v alergických reakciách. Niektoré kapitoly boli skrátene, aj keď podľa môjho názoru to mohlo byť ešte výraznejšie, keďže sú nad rámec témy tejto diplomovej práce (napr. podkapitola 2.3.7 Schopnosť rozoznávať patogény – Pattern-recognition receptors PRR). Spomínaná nová kapitola 2.3.6 Subpopulácie naivných CD4<sup>+</sup> T-lymfocytov je v literárnom prehľade nevhodne začlenená, keďže patrí do väčšej kapitoly 2 Dendritické bunky.

Niektoré vety a odseky majú skôr vedecko-populárny charakter ako odborný (napr. podkapitola 2.1 Objavenie dendritických buniek, str. 27).

V podkapitole 2.2 Vývoj dendritických buniek je odsek (str. 28) týkajúci sa hlavného významu DC, ktorý pôsobí vytrhnutý z kontextu a nezapadá do tejto kapitoly. Podľa môjho názoru mal by byť súčasťou podkapitoly 2.3 Úloha DC v imunitnom systéme.

Práca je založená na veľkom množstve literárnych zdrojov (235 citácií), ale z nich je iba 30 nových (od roku 2013). Žiaľ, aj na počte citácií, ktorý vysoko prevyšuje potreby diplomovej práce, je vidieť, že niekedy kvantita môže byť na úkor kvality.

Ďalšie závažné pripomienky budú uvedené nižšie.

## **Materiál a metódy:**

Použité metódy zodpovedajú experimentálnej kapitole a sú zrozumiteľne popísané.

## **Experimentálna časť:**

V predošlom posudku bola pripomienka k chýbajúcej hypotéze na začiatku popisovania výsledkov, nebol uvedený účel experimentov a to platí aj pre túto novú verziu práce.

Platí tá istá pripomienka ako v predošlom posudku a to, že podkapitolu 5.1 *E.coli* O83 zvyšuje percento CD83<sup>+</sup> mDC je podľa môjho názoru možné spojiť s podkapitolou 5.2 Porovnanie mDC a pDC u skupín detí zdravých a alergických matiek po stimulácii *E. coli* O83, keďže v oboch prípadoch sú popisované tie isté výsledky a nie je dôvod, aby boli uvedené osobitne. V prvej podkapitole sú uvedené dot ploty z gatovacej stratégie a v druhej podkapitole sú výsledky vo forme stĺpcových grafov.

Ďalšie nedostatky budú zhrnuté v pripomienkach, resp. otázkach.

## **Diskusia :**

Pre diskusiu platia rovnaké pripomienky ako v predošlom posudku.

Diskusia skôr pripomína kapitolu Výsledky. Autorka iba konštatuje svoje výsledky, ale nedáva ich do súvisu s pôvodnou hypotézou ani s inými prácami v danej oblasti a ak, tak iba v kontexte, či dané výsledky korelujú medzi sebou alebo nie, ale nie je z toho väčšinou vyvodенý žiadny záver.

## **Závery (Súhrn):**

Závery korešponujú s cieľmi práce, ale podľa mňa nie sú zasadené do širšieho kontextu (spomínaná absencia pôvodnej hypotézy).

## **Formálna úroveň práce** (obrazová dokumentácia, grafika, text, jazyková úroveň):

Štylizácia textu je už na lepšej úrovni v porovnaní s minulou prácou, kde sa objavovali slovné spojenia a vety, ktoré neboli správne, resp. nedávali zmysel. Aj keď niektoré vety s nesprávnou štylizáciou ostali aj v novej verzii práce a autorka sa nevyhla chybám, aj napriek tomu je práca na lepšej úrovni.

Grafická úroveň práce je dobrá, ale mám niekoľko pripomienok, ktoré sú uvedené nižšie.

## **Pripomienky:**

*Podobné resp. rovnaké pripomienky ako v predošlom posudku, ktoré neboli zapracované v novej verzii práce:*

- 1) V texte sa vyskytujú chyby, niekoľko preklepov, v niektorých prípadoch chýbajú čiarky, alebo sú nesprávne uvedené. V niektorých kapitolách sú roky písané ako číslice a tisícky sú oddelené medzerou od ostatných čísiel.

Niektoré vety by si vyžadovali štylistickú úpravu, napr.: „*Nezrelé DC sídli takmer vo všetkých orgánoch indukujúce T bunkovú anergiu.*“, (str. 36); „*...exprimujú vysokými*

hladinami...“ (str. 43); „Ciele práce boli uskutočnené analýzou vplyvu *E. coli* O83 na produkciu subpopulácií DC po ich získaní izoláciou *in vitro*.“ (str. 88). V dvoch prípadoch sa v texte vyskytujú gramatické chyby typu zámeny „i“/“y“ (napr: ... neutrof“y“l ..., str. 17; .... bakteriáln“i“mi kmeňmi, str. 81). V práci sú nejednotne uvádzane jednotky, niekedy s medzerou a niekedy bez medzery za číslovkou.

- 2) Popisy v obrázkoch sú v angličtine, podľa môjho názoru je lepšie zjednotiť to s jazykom, v ktorom je písaná celá práca Tab. 4 nie je potrebná, keďže je to už uvedené v Tab. 3. Na Obr. 7 je neúplný popis zobrazenej skúmavky.
- 3) Odkaz v texte na Obr. 1 (str. 22) nie je správne uvedený, na obrázku je znázornené niečo iné, ako sa pojednáva v texte. Nie je vhodné, ak legenda k obrázku nie je na tej istej strane (Obr. 12). V niektorých prípadoch nie sú obrázky v texte spomenuté v nadväznosti, napr. v kapitole Výsledky najprv uvádzate Obr. 11 a až potom Obr. 9 a 10 (str. 68). V legende k Obr. 11 chýba popis gatovacej stratégie mDC a pDC, je uvedený iba znak CD83 (nie je uvedená populácia buniek, na ktorej sa daný znak CD83 vyskytuje, resp. je detegovaný).
- 4) Obr. 9c, 10c a 12 nemajú v popise k dot plotom uvedené, o aký znak sa jedná, v popise je iba fluorochróm, ale ten nie je podstatné uvádzať.
- 5) Str 73: „U charakteristického transkripčného faktora pre Th1 populáciu T-lymfocytov, T-bet, boli pozorované vyššie hodnoty tohto transkripčného faktora u mDC...“ Transkripčný faktor ste nedetegovali u mDC.
- 6) Veľakrát v texte pri popise výsledkov uvádzate slovo trend, zvýšená produkcia, mierny vzostup, atď, ale jedná sa o neodborný spôsob vyjadrovania sa, keďže ide o nesignifikantné zmeny. Príklady: „Pri hodnotení prítomnosti transkripčného faktora ROR $\gamma$ t, ktorý je charakteristický pre Th17 imunitnú odpoveď, bol zaznamenaný mierny vzostup expresie ROR $\gamma$ t u T-lymfocytov kokultivovaných s mDC detí alergických matiek (Obr. 13f).“, str. 73; „Rozdiely sa objavujú u IL-22, kde u mDC pozorujeme zvýšenú produkciu u A skupiny oproti Z jedincom.“, str. 87.
- 7) V kapitole Zoznam použitej literatúry nie sú označené články, ktoré sú review. Formát použitých literárnych zdrojov nie je jednotný, vyskytujú sa v ňom chyby a to v menách autorov (napr. cit. č. 149, kde namiesto „Fehérvári“ je uvedené „Feh??rv??ri“), resp. celkovo vo formáte citácií (napr. cit. č. 6 „Interferon?????“, „cord???blood“, „IgE???levels“). V Zozname použitej literatúry chýbajú odkazy na internetové zdroje použité pri Obr. 4-8. V kapitole 1.6.2 na str. 25 je táto veta: „Bakteriálna kolonizácia čreva alebo perorálne podávanie usmrtených baktérií bola testovaná ako prevencia proti enterickým infekciám a ako stimulácia lokálneho imunitného systému u zvierat, dospelých a tiež dojčiat [39].“ Daná citácia sa týka iba dojčiat.

Ako závažná pripomienka v predošlom posudku k Zoznamu použitej literatúry bolo uvádzanie neodborných a nevhodných zdrojov, ale aj napriek tomu ostali aj v novej verzii práce. Podľa môjho názoru nie je prípustné považovať za literárny zdroj www. stránku [www.pediatriepropraxi.cz](http://www.pediatriepropraxi.cz) pre informácie o vývoji črevnej mikrobioty. Daný literárny zdroj pôsobí ako informačné oznámenie lekára pre verejnosť a cituje zo zdrojov z Nestlé Nutr Workshop Ser Pediatr Program, resp. článku z roku 1993.

- 8) V kapitole Diskusia, resp. v kapitole Záver, chýba celkové prihliadnutie na to, že všetky Vaše vzorky sú z pupočníkovej krvi. To znamená, že obsahujú bunky dieťaťa aj matky, neviete ich od seba odlíšiť. Chýba komentovanie výsledkov so zreteľom na túto skutočnosť. Rovnako chýba diskusia k porovnaniu výsledkov Vašej práce so situáciou *in vivo* po podaní vakcíny novorodencom, keďže ide o úplne iné prostredie (črevo + celý mikrobióm).

Sú to pripomienky z predošlého posudku, ktoré neboli zapracované v novej verzii práce.

#### *Nové pripomienky:*

- 1) Na str. 26 máte uvedenú túto vetu: „Výsledkami a metódami týchto pokusov sa podrobnejšie zaoberá štvrtá a šiesta kapitola.“ Ide o vetu z predošlej verzie práce, v novej verzii nesedí označenie kapitol.
- 2) 2 posledné odseky v podkapitole 2.3.5 Produkcia cytokínov obsahovo nie sú vhodné do tejto kapitoly.
- 3) Dot ploty znázornené na Obr. 12 nemajú rovnakú veľkosť a nie sú voči sebe zarovnané.
- 4) Odporúčam zachovať spôsob vyjadrenia grafov u Obr. 13 a 14 ako bol v predošlej práci, kde bolo zároveň vidieť, koľko vzoriek tvorí jednu skupinu, u stĺpcových grafov to nie je možné.
- 5) Popisy k prílohám 2 a 3 sú nedostatočné. Máte uvedené: „Bunky neznačené CD11c v prípade mDC a CD123 vrámci pDC“, alebo „Porovnanie negatívnej kontroly (vľavo) a FMO (vpravo)“ Z daného popisu vôbec nie je zrejmé, ku ktorému experimentu sa daná príloha vzťahuje. Obrázky musia byť samovysvetľujúce. Iba na str. 72 je uvedená táto veta: „Porovnanie negatívnej kontroly (čiže buniek neznačených CD4 protilátkou, transkripčnými faktormi či cytokínmi) a FMO je zobrazený v Prílohe 3.“, ale tá je nedostačujúca.
- 6) Na str. 84 v diskusii porovnávate výsledky práce s inými autormi a tvrdíte, že sú v súlade, ale potom uvádzate takúto vetu: „Keďže v ich práci tvorilo kontrolnú skupinu len 5 zdravých jedincov, výsledky nie sú dostatočne validné.“ Naskytá sa otázka, prečo porovnávate výsledky s výskumom, ku ktorému máte výhrady?
- 7) V diskusii uvádzate túto vetu (str. 85): „Práca Farkasa *et al.* popisuje mierne zvýšenú produkciu IFN- $\gamma$  po stimulácii alergénom u DC všeobecne, avšak vyššia produkcia bola prítomná u pDC, než u mDC, čo koreluje s dátami uvedenými v tejto práci [226].“ Opäť nesprávna formulácia, predpokladám, že sa malo jednať o CD4<sup>+</sup> bunky a nie DC.

#### **Otázky:**

*Podobné resp. rovnaké otázky ako v predošlom posudku, ktoré neboli zapracované v novej verzii práce:*

- 1) Na str. 39 je táto veta: „Z najrôznejších štúdií posledných dvoch dekád vyplýva vzájomná negatívna interakcia medzi Th1 a Th2 subpopuláciou.“ Ako si vysvetľujete Vaše výsledky v kapitole 5.3, ktoré vyznievajú v rozpore s týmto tvrdením? Z výsledkov

vyplýva, že v kultúre buniek je okolo 50 % Th1(% T-bet) a 50 % Th2 (% GATA3, IL-4) buniek. Môže existovať takáto kultúra s takouto diverzitou? V rovnakej kultúre sú ešte detegované populácie Treg a Th17, a tak celkový súčet je vyšší ako 100 %. Na str. 40 tvrdíte o Treg: „Majú schopnosť suprimovať vznik Th1 a Th2 alergickej odpovede.“ Je možné vzťahnúť toto tvrdenie aj na Vaše výsledky?

Pripomínam, že podobné otázky už boli položené pri minulej obhajobe, ale zjavne neboli vzaté na zreteľ. Ak by sa jednalo o výsledok nastavenia a prevedenia Vášho pokusu, ktorý nie je relevantný s podmienkami *in vivo*, tak vyvstáva otázka relevantnosti týchto výsledkov.

- 2) Nemôžete pozorovať pri Vašom nastavení pokusu a kontrol vplyv iba kokteilu na aktiváciu leukocytov (Leukocyte Activation Cocktail) pri výsledkoch z kokultivácie buniek? Aké má zloženie daný kokteil? V diskusii (str.84) uvádzate túto vetu: „V diplomovej práci bol použitý jediný stimulans, a to *E. coli* O83, čiže to, ako by sa bunky chovali po stimulácii s PHA nevieme posúdiť z dôvodu nedostatočného počtu buniek.“ Čo nie je úplne presné tvrdenie, keďže používate kokteil na aktiváciu leukocytov.

V predošlom posudku som sa pýtala na príslušné kontroly k pokusu (CD4<sup>+</sup> bunky bez akejkoľvek kultivácie a stimulácie) a povedali ste mi, že neboli robené. Podľa môjho názoru si nemôžete byť istí, či sú dané výsledky správne vyhodnotené. U skoro všetkých transkripčných faktorov je hranica medzi pozitívnymi a negatívnymi bunkami vedená v polovici populácie, podobne je tomu aj u niektorých cytokínov. V prílohe síce uvádzate bunky neznačené protilátkou a FMO kontroly, ale v tomto prípade si myslím, že to ako kontrola nie je dostačujúce. A navyše z popisu (resp. nedostatočného popisu) príloh nie je zrejmé, či dané prílohy patria k tomu istému pokusu, na ktorom uvádzate gatovaciu stratégiu. Jednotlivé populácie vôbec nie sú zreteľne oddelené a z Vášho nastavenia pokusu nemôžete vedieť, či sa nejedná iba o nešpecifický posun celej populácie. Môžete uviesť (kludne aj z predošlých pokusov vo Vašom laboratóriu) dot plot z tohoto experimentu pre nestimulované a s ničím nekultivované CD4<sup>+</sup> bunky? Ako by vyzeralo značenie v danom prípade? Viete, ako vyzerajú CD4<sup>+</sup> bunky bez pridania aktivačného kokteilu? Táto kontrola je veľmi dôležitá.

Je v poriadku samotné značenie s protilátkou CD4, bola daná protilátka pred použitím titrovaná? Očakávala by som jednoznačnejšie oddelenú populáciu buniek.

Nebolo by vhodné pri nastavovaní cytometra použiť celú škálu nastavenia intenzity fluorescencie, aby boli pozitívne bunky niekde na stupnici okolo 10<sup>4</sup>, aby ste vedeli lepšie odlíšiť, ktoré bunky sú negatívne a ktoré pozitívne?

Žiaľ, ani tieto nové reprezentatívne dot ploty nie sú presvedčivé a opäť skôr poukazujú na nevierohodnosť Vami prezentovaných výsledkov z kokultivácie buniek.

## Nové otázky:

- 1) Uvedte tvrdenia v abstrakte na pravú mieru. „Vyššia expresia aktivačného znaku CD83 na stimulovaných mDC a vyššia prítomnosť intracelulárnych cytokínov u CD4<sup>+</sup> T buniek kokultivovaných s mDC stimulovanými probiotickým kmeňom *E. coli* O83 bola pozorovaná u detí alergických matiek.“ Podľa mňa sa jedná iba o cytokín IL-10 a nie viacero cytokínov, ako tvrdíte. „Po kokultivácii pDC stimulovaných *E. coli* O83 s CD4<sup>+</sup> došlo k významnému zvýšeniu produkcie IL-10 a IL-17A u CD4<sup>+</sup> T bunkách u detí zdravých matiek v porovnaní s CD4<sup>+</sup> T bunkami kultivovanými s nestimulovanými DC.“ Na grafe nie je znázornená žiadna významná zmena pre IL-17. Z grafu vyplýva významná zmena medzi skupinami ZO83 a AO83 pre IL-10, ale nie medzi skupinami, kde boli bunky nestimulované probiotickým kmeňom. Podobné tvrdenie je aj v diskusii v 1. vete: „Stimulácia probiotickým kmeňom *E. coli* O83 podporovala indukciu maturácie mDC a rovnako tak pDC detí zdravých a alergických matiek.“ Na základe čoho tvrdíte, že aj pDC?
- 2) Na str. 79 uvádzate: „U mDC bola detegovaná prítomnosť prozápalových IL-6, TNF- $\alpha$  a protizápalového cytokínu IL-10.“ Ako si daný výsledok vysvetľujete, ako zapadá do Vašej hypotézy? Takéto zdôvodnenie by bolo vhodné uviesť v diskusii.
- 3) V metódach (str. 59) máte uvedené: „... 100 000 mDC a na kokultiváciu k nim bolo pridaných  $1 \times 10^6$  CD4<sup>+</sup> buniek ...“ Na základe čoho bol zvolený tento pomer buniek? Máte skúsenosti aj s nasadzovaním buniek v inom pomere, resp. očakávali by ste rovnaký výsledok?
- 4) U Obr. 12 (str. 75) ste mali opraviť gatovaciu stratégiu. V novej verzii práce je zmenený prvý dot plot - výber buniek, ale následne dublety a CD4<sup>+</sup> bunky vyzerajú rovnako ako minule s rovnakým percentuálnym zastúpením buniek. Je to možné, keď sa Vám zmení gate v 1. kroku, aby všetko ostatné bolo rovnaké s minulým?

Ako ste vyhodnocovali výsledky v prvom prípade, keďže ste teraz zmenili gatovaciu stratégiu, ale to sa vo výsledku nepremietlo do zmenených grafov?

## Splnenie cieľov práce a celkové hodnotenie:

Záverom komisie pri predošlej obhajobe bolo prepracovanie danej práce na základe pripomienok, ktoré zazneli na obhajobe, bez nutnosti ďalších experimentov.

Autorka zakomponovala niektoré formálne pripomienky, čo zlepšilo kvalitu práce, ale nie všetky. Nezačlenenie všetkých pripomienok do novej verzie, a to ani tých, ktoré boli v predošlom posudku, podľa môjho názoru svedčí, žiaľ, aj o samotnom prístupe k práci.

Obsahová stránka práce je dôležitejšia než formálna a v tomto ohľade nie je veľmi vidieť zlepšenie. Autorka nepreukázala schopnosť kritického pohľadu na získané výsledky.

Predložená diplomová práca obsahuje podľa môjho názoru stále závažné nedostatky, ale aj napriek tomu prácu odporúčam na obhajobu a navrhujem celkové hodnotenie dobre.

Dátum: 23.1.2018

Mgr. Valéria Grobárová, Ph.D.