

Oponentský posudek na bakalářskou práci **Martiny Jeníkové** s názvem

Vliv etiocholanolonu na produkci cytokinů izolovanými lidskými lymfocyty

Úvodem bych rád poděkoval za možnost oponovat tuto práci, zvláště proto, že se jedná o práci, kterou vedl můj bývalý školitel, profesor Ladislav Jánský, do okamžiku, než ho v loňském roce postihla tragická nehoda. Uvědomuji si složitou situaci, která tím studentce Martině Jeníkové vyvstala. Zároveň smekám před rozhodnutím Mgr. Jana Okrouhlíka, který se posléze ujal vedení této práce a vzal tak na sebe nelehké břímě.

V předložené bakalářské práci Martina Jeníková zkoumá vliv steroidní látky etiocholanolon, což je metabolit mužského pohlavního hormonu testosteronu, na produkci tří cytokinů IL-1 β , TNF- α a INF- γ izolovanými mononukleárními buňkami periferní krve člověka (dále PBMC). Je známo, že etiocholanolon nevykazuje žádnou hormonální aktivitu, v několika pracích byl však jednoznačně prokázán jeho pyrogenní účinek na člověka (je exogenním pyrogenem a po injekční aplikaci vyvolává horečku). Cílem této práce bylo v *in vitro* podmínkách zjistit, zda se pyrogenní účinek etiocholanolonu realizuje nepřímou přes zvýšenou produkci výše jmenovaných cytokinů, které jsou klasickými endogenními pyrogeny a v podmínkách *in vivo* indukují nástup horečky.

Práce v rozsahu 36 stran je tradičně avšak přehledně členěna na úvod, přehled problematiky, kde je také definován cíl práce, dále na část materiál a metody, experimentální výsledky s přiřazenými grafy, diskuzi a závěr.

V Úvodu autorka ve dvou odstavcích shrnuje vztah mezi cytokiny a jejich pyrogenními účinky a uvádí nás tak do problematiky horečky jako systémové odpovědi celého organismu. Trošku zde postrádám alespoň zmínku o pyrogenním účinku zkoumané látky etiocholanolonu, se kterým autorka experimentovala.

Část Přehled problematiky považuji za velmi pěkně a hlavně přehledně zpracovanou, autorce se zde daří skloubit jednotlivé teoretické části problematiky cytokinů, horečky a steroidních látek tak, že ve výsledku působí přehled provázaně a logicky vzhledem k celé práci a k cíli, který autorka na konci přehledu jasně definuje. Velmi uspokojivé množství citací v této části svědčí o autorčině dobré orientaci v literatuře. Zároveň se však autorka dopustila v citacích množství nepřesností, způsobených však zřejmě pouze nepozorností. Namátkou:

- citace Paya et al., 1987 na str. 8 ve výčtu literatury na konci práce zcela chybí
- chybně uváděné roky publikací citací v textu a na konci v seznamu literatury (Kobayashi et al., 1987 místo 1989 na str. 8, Freeman et al., 1977 místo 1997 na str. 12)
- zkomolená jména autorů ať už v citacích v textu či v seznamu literatury (Cost, Isaccs, Lugeschi)
- publikace Kluger a kol. v seznamu literatury uváděn dvakrát
- také protože se jedná o práci psanou v češtině, považuji za vhodnější nahradit latinské „et al.“ v citacích českým výrazem „a kol.“

Část Materiál a metody: Během manipulace s krví a kultivace buněk autorka zvládá práci v aseptických podmínkách a osvojuje si metodu izolace PBMC. Ke kvantifikaci cytokinů využívá imunologickou metodu ELISA „sendvičového“ typu s biotin-streptavidinovou vazbou. K metodické části bych měl na autorku 3 dotazy:

- Sledovala autorka produkci cytokinů z izolovaných mononukleárních buněk (tedy jak lymfocytů tak monocytů), jak ve většině textu uvádí nebo sledovala produkci pouze izolovanými lymfocyty, jak je uvedeno v názvu práce?

- Na str. 14 cituje z práce Dillarda a Bodela, „Etiocholanolon snadněji vyvolává horečku u mužů než u žen.“ Proč autorka nevyzkoušela jako dobrovolné dárce také nějaké muže? Bylo by jistě zajímavé porovnat v práci výsledky z obou pohlaví. * Jan. dárce - byl forse aeny

- Na str. 19, ve vztahu k aplikaci etiocholanolonu, autorka píše „(poločas rozpadu steroidních hormonů se pohybuje v hodinách až desítkách hodin a jejich účinek se dostaví po delší době, proto byla zvolena doba inkubace 18 hodin)“. Toto tvrzení je ale v rozporu s faktem, že etiocholanolon žádnou hormonální aktivitu nemá (jak sama ostatně na str. 14 a podruhé na str. 26 uvádí). Může nějak tento rozpor autorka vysvětlit?

V části Experimentální výsledky uvádí autorka přehledné a jasně popsané grafy výsledné koncentrace cytokinů, které naměřila po 18. hodinách kultivace po aplikaci různých dávek etiocholanolonu. Prezentuje zde také jednu ukázkovou kalibrační křivku pro cytokin IL-1 β (str.22), chybí však kalibrační křivky pro cytokiny TNF- α a INF- γ . Chce to autorka nějak komentovat? Také bych prosil autorku o vysvětlení popisků jednotlivých grafů, konkrétně co přesně znamená „n“ (tedy počet měření) v případě měření produkce IL-1 β a TNF- α a co v případě měření produkce INF- γ ? Poslední výtka v této části směřuje k faktu, kterého si je autorka vědoma, a to absenci nějaké další kontroly bez metanolu, čímž by byl potvrzen či vyloučen spekulativní vliv metanolu na produkci cytokinů izolovanými buňkami.

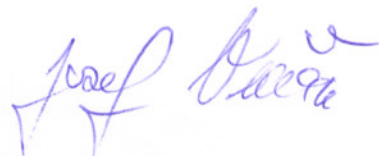
V Diskuzi srovnává autorka své výsledky s dostatečným množstvím jiných prací zabývajících se pyrogenními účinky etiocholanolonu; všechny tyto práce jsou však publikovány v 50. a 60. letech, kdy ještě nebyly účinky cytokinů pořádně známy a dané práce zkoumají vliv tohoto steroidu především na základě fyziologických změn v organismu v průběhu horečky po aplikaci této steroidní látky. Opět je zde úctyhodný počet citací.

Závěr práce je stručný a jasný a v případě TNF- α a INF- γ přináší i statisticky průkazné výsledky, avšak myslím si, že poslední tvrzení „...pyrogenní účinek etiocholanolonu se nerealizuje prostřednictvím zvýšené produkce cytokinů IL-1 β , TNF- α a INF- γ .“ je poněkud unáhlený vzhledem k tomu, že autorka měřila produkci cytokinů pouze po 18 hodinách kultivace. Na autorku mám ještě tyto tři otázky:

1. Proč nevyzkoušela autorka měřit produkci cytokinů po kratší inkubační době po aplikaci etiocholanolonu, např. po šesti hodinách? Pokud symptomy horečky nastupují již během 6 hodin po podání etiocholanolonu, jak bylo prokázáno některými pracemi, jež autorka cituje, tak v případě, že tak etiocholanolon činí prostřednictvím zmíněných cytokinů, musely by být tyto cytokiny produkovány již v této rané době, jelikož symptomy horečky jsou následkem jejich působení.
2. Napadá autorku ještě jiný důvod snížené produkce TNF- α mononukleárními buňkami než vlivem glukokortikoidů jak uvádí v diskuzi? Narážím zde na úskalí, které s sebou izolace PBMC přináší a souvisí to se změněným početním poměrem lymfocyty/monocyty po procesu izolace PBMC (zabývala se tím např. práce DeGrooteho z r.1992, která porovnává dvě metody kultivace mononukleárních buněk a následnou produkci cytokinů těmito buňkami, a to metodu izolace PBMC s metodou, kdy nebyly buňky izolovány, ale kultivovány přímo v naředěné krvi).
3. Má autorka nějakou představu využití získaných poznatků ať už pro další studium či diagnostické účely?

Závěrem: I přes určité prvky, které tato práce, co se metodické stránky týče, postrádá (kontrola bez metanolu, měření produkce cytokinů ve více časových intervalech, měření i z mužské krve) a což ji tím pádem činí poněkud povrchnější a přes drobné formální nedostatky (občasné překlepy v textu či nesrovnalosti v literatuře), přináší práce některé jasné výsledky a autorka nejenže prokázala schopnost samostatně plánovat a provádět experimenty s konečným vyhodnocením dat, ale prokázala také velmi dobrou orientaci ve vědecké literatuře. Tuto práci určitě doporučuji k obhajobě jako jeden z podkladů pro udělení bakalářského titulu.

V Českých Budějovicích, 25.5.2008



Josef Večeřa
oponent