

Oponentský posudek magisterské diplomové práce
Bc Marie Hezckové
PřF Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích

**Regulace metabolismu cholesterolu v játrech pražského hereditárně
hypercholesterolemického potkana**

Rozsah práce

Předložená diplomová práce je psána v češtině a dokazuje velmi dobré formulační schopnosti autorky. Práce má rozsah 69 stran a zahrnuje obsáhlý literární přehled, vymezení cílů, popis metodických postupů, výsledkovou část a diskuzi integrující jednotlivá zpracovávaná témata. Celá práce je psána velmi jasným a věcným slohem, oceňuji zejména výstižnost a stručnost vyjadřování.

Cíle

Hlavním cílem studie bylo objasnění některých aspektů patogeneze hypercholesterolemie Pražského hereditární hypercholesterolemického potkana (PHHC). Předkládaná práce se soustředila na následující dílčí otázky:

1. Příčiny akumulace cholesterolem obohacených VLDL u PHHC potkanů na cholesterolé dietě:
 - a. sekvence genu kódujícího apolipoprotein E a potvrzení přítomnosti tohoto proteinu ve VLDL,
 - b. stanovení složení nascentních VLDL produkovaných játry.
2. Charakterizace dvou vybraných genů, které jsou u PHHC potkanů odlišně exprimovány:
 - a. *Aldh1a7* – na biochemické úrovni.
 - b. *ApoE* – na molekulárně biologické úrovni.

Téma diplomové práce je vysoce aktuální vzhledem k vysoké prevalenci aterosklerózy a s ní spojených zdravotních komplikací.

Úvod

předložené diplomové práce je věnován literárnímu přehledu o současném stavu řešené problematiky. Detailně je popsána biochemie plazmatických lipidů a lipoproteinů. Oceňuji výstižné shrnutí dosavadních poznatků týkajících se metabolismu cholesterolu u PHHC, které čtenáři umožňuje snadnější orientaci. Na této části práce lze vyzdvihnout konzistentní a věcný přístup, který čtenáři poskytuje dostatečný přehled vztahující se k řešené problematice a přitom nezabíhá do zbytečných podrobností.

Metodická část

Autorka zvládla široké spektrum separačních, biochemických a molekulárně biologických metod. Metody jsou přehledně a dostatečně podrobně popsány.

Výsledková část

stručně shrnuje získaná data. Získané výsledky jsou přehledně popsány a názorně doloženy v grafech a tabulkách. Drobné připomínky mám pouze k popisu grafů (viz dále). Z hlavních výsledků lze uvést:

1. Autorka se zabývala původem VLDL částic abnormálně nasycených cholesterolem a prokázala, že u tohoto modelu vznikají již při syntéze v játrech. Vyloučila možnost, že akumulace těchto VLDL souvisí s defektem v genu pro ApoE.

2. Předložená práce prokazuje změny v aktivitě aldehyddehydrogenasy 1a7 u PHHC potkanů ve srovnání s potkany kmene Wistar a dále upozorňuje na zajímavou nesrovnalost ve výsledcích získaných stanovením exprese enzymu na úrovni mRNA a na úrovni jeho aktivity.
3. Byla popsána nová inzerční mutace v genu kódujícím ApoF u PHHC potkanů.

Získané výsledky prokazují, že autorka precizně zvládla řadu laboratorních metod a dosáhla při řešení sledovaných otázek i několika nových poznatků.

Diskuse

V diskuzi autorka podává komentář k získaným výsledkům, který svědčí o dobré znalosti problematiky a schopnosti uvést vlastní výsledky do širšího kontextu.

Připomínky a dotazy:

K práci nemám žádné závažné připomínky, dotazy směřují pouze k upřesnění některých detailů nebo představují návrhy pro další práci, zejména co se týče drobných formálních neobratností.

1. Str. 46 Porovnání koncentrace TAG a koncentrace cholesterolu bylo provedeno pomocí parametrických testů. Byla kontrolována normalita rozložení dat?
2. Existuje zvířecí knock-out model pro ApoF? Pokud ano, s jakými fenotypovými projevy?
3. Lze prokázat ApoF na SDS-PAGE? Pokoušeli jste se o to (viz obr 5.3)?
4. U popisu všech grafů chybí údaj týkající se počtu zvířat ve skupině.
5. U grafů i tabulek není uvedena významnost rozdílů mezi skupinami přímo v grafu/tabulce, ale pouze v textu. Tento způsob je ve vědecké literatuře velmi neobvyklý a výrazně ztěžuje orientaci čtenáře.
6. Obr. 5.3: ApoE je přítomno jak u PHHC, tak i Wistar potkanů, ale pouhým okem se zdá, že u PHHC potkanů je intenzita bandu poloviční. Byl sledovaný protein nějak kvantifikován nebo tato metoda umožňuje pouze kvalitativní odpověď stylu ano/ne?

Závěr:

Předložená práce řeší aktuální a významnou problematiku. Studie byly provedeny na pracovišti, kde oblast výzkumu metabolismu cholesterolu má tradičně vysokou úroveň. Pečlivé shrnutí současných poznatků o problematice a věcná interpretace získaných výsledků dokazuje, že autorka je seznámena s problematikou v dané oblasti a je schopna další vědecké práce při řešení zvolené problematiky. Celkově má magisterská diplomová práce velmi dobrou úroveň.

Práce splňuje požadavky kladené na magisterskou diplomovou práci, a proto navrhuji klasifikovat předloženou práci stupněm jedna a udělit akademický titul magistr (Mgr).

Monika Cahová, PhD.
Pracoviště experimentální medicíny
IKEM, Praha

Praha, 31. 5. 2010

Konstatuji, že Bc. Marie Heczková zodpověděla všechny dotazy k mé plné spokojenosti. Doporučuji přijmout práci k obhajobě a klasifikovat stupněm jedna.

Monika Cahová

Monika Cahová, PhD.

Praha 2. 6. 2010

Pracoviště experimentální medicíny IKEM

Připomínky a dotazy položené v posudku Moniky Cahové, PhD.:

1. Str. 46 Porovnání koncentrace TAG a koncentrace cholesterolu bylo provedeno pomocí parametrických testů. Byla kontrolována normalita rozložení dat?

Normalita rozložení dat kontrolována nebyla.

O koncentraci cholesterolu je známo, že má normální rozdělení, pracovala jsem tedy jen s původními daty.

V případě koncentrací TAG byly provedeny testy pro data původní i pro data získaná logaritmickou transformací. Mezi výsledky testů nebyly výrazné rozdíly. Pro prezentaci byly zvoleny výsledky porovnání zlogaritmovaných dat, protože u člověka se k normalizaci těchto dat používá rovněž logaritmická transformace.

2. Existuje zvířecí knock-out model pro ApoF? Pokud ano, s jakými fenotypovými projevy?

Žádný takový model se nám najít nepodařilo.

3. Lze prokázat ApoF na SDS-PAGE? Pokoušeli jste se o to (viz obr 5.3)?

V současné době se kolegyně snaží tento protein identifikovat jedinou známou protilátkou proti potkanímu ApoF, zatím bohužel bezúspěšně.

Na zmiňovaném obrázku jsou pouze proteiny obsažené ve VLDL částicích, ApoF je ale asociován s jinými třídami lipoproteinů, zejména s HDL a LDL.

4. U popisu všech grafů chybí údaj týkající se počtu zvířat ve skupině.

Děkuji za upozornění na nedostatek, ve svých příštích pracích se mu vyhnu. Tyto údaje jsou uvedeny v kapitole 4.2 Pokusy na zvířatech.

5. U grafů i tabulek není uvedena významnost rozdílů mezi skupinami přímo v grafu/tabulce, ale pouze v textu. Tento způsob je ve vědecké literatuře velmi neobvyklý a výrazně ztěžuje orientaci čtenáře.

Děkuji za upozornění na nedostatek, ve svých příštích pracích se mu vyhnu.

6. Obr. 5.3: ApoE je přítomno jak u PHHC, tak i Wistar potkanů, ale pouhým okem se zdá, že u PHHC potkanů je intenzita bandu poloviční. Byl sledovaný protein nějak kvantifikován nebo tato metoda umožňuje pouze kvalitativní odpověď stylu ano/ne?

Denzitometrické vyhodnocení gelů sice kvantifikaci umožňuje, my jsme se ale rozhodli použít tuto metodu pouze pro zjištění přítomnosti proteinů ve VLDL částicích.

Při případné kvantifikaci je ale důležitý poměr intenzity signálu odpovídající ApoE / ApoB. Bandy odpovídající ApoB mají u PHHC rovněž nižší intenzity. Sice máte pravdu, že u Wistar potkanů je i tento poměr zvýšený, nicméně rozdíl není natolik dramatický, abychom z toho vyvodili nějaké jiné závěry než že u PHHC potkanů je ApoE přítomen.

Oponentský posudek

diplomové práce Bc. Marie Heczkové: Regulace metabolismu cholesterolu v játrech Pražského hereditárně hypercholesterolemického (PHHC) potkana

Diplomantka se ve své práci zabývala detailní analýzou vybraných mechanismů vzniku hypercholesterolemie u kmene laboratorních potkanů s dietou indukovatelnou hypercholesterolemií (Pražský hereditárně hypercholesterolemický potkan- PHHC). Přestože tento experimentální model polygenní hypercholesterolemie se ve výzkumu poruch metabolismu sérových lipidů používá již více než 25 let, stále není přesný mechanismus jejího vzniku objasněn. Autorka rozpracovává ve své práci tři základní otázky, na něž hledá odpověď ve správně navržených experimentálních postupech. Dochází tak k zajímavým a novým závěrům, které upřesňují současné představy o faktorech vedoucích k elevaci cholesterolemie u PHHC potkanů (produkce na cholesterol bohatých VLDL částic v hepatocytu PHHC potkana jako hlavní mechanismus, možný vliv nově detekovaného polymorfismu v regulační oblasti genu pro apolipoprotein E nebyl autorkou prokázán). Autorka zavádí zcela novou metodiku hodnocení aktivity aldehydehydrogenázy 1a7, která je srovnatelná mezi kmeny PHHC potkanů a kontrolami. Nebyly tak potvrzeny předpoklady ze studií hodnotících genovou expresi, které popisovaly významně vyšší transkripci uvedeného enzymu u PHHC zvířat než u kontrol. Ve třetí části práce autorka analyzuje gen pro apolipoprotein F, jehož exprese je u PHHC potkana významně vyšší než u kontrolních potkanů a nachází v něm novou inzerici zastoupenou v homozygotní konstituci u všech PHHC potkanů, zatímco u kontrolních potkanů kmene Wistar se uvedená inzerce vyskytuje pouze u ¼ zvířat.

Práce je pozoruhodná z několika aspektů. Rozpracovává zajímavé téma genetické determinace hypercholesterolemie u PHHC potkanů za použití moderních postupů molekulární biologie. V průběhu práce byla zavedena zcela nová metodika. Výsledky práce obsahují nové dosud nepublikované poznatky.

Po formální stránce je hodnocená práce zpracována podle požadavků kladených na diplomové práce a splňuje všechna formální kritéria. Členění i rozsah jednotlivých kapitol jsou správné a adekvátní. Metodická část je zpracována přehledně. Zvolené metody byly správně vybrány k ověření stanovených hypotéz. Výsledky experimentů jednoznačně podporují závěry práce. Použitá literatura je adekvátní, větší množství citací starších 15 let je vysvětlitelné odkazy na metodické práce z minulosti.

Diplomantce bych položil následující otázky.

1. Existuje u PHHC potkana polymorfismus genu pro apolipoprotein E podobný jako byl popsán v lidské populaci?
2. Byly v genu pro apoE u PHHC popsány ještě jiné mutace než Vámi zjištěná nukleotidová záměna?
3. Můžete spekulovat, jakým způsobem by mohl apoF a Vámi zjištěný inzerční polymorfismus tohoto genu ovlivnit produkci VLDL částic vznikajících v hepatocytu PHHC potkana?

Celkově lze diplomovou práci Bc. M. Heczkové hodnotit velmi kladně a lze ji doporučit k obhajobě.

Diplomantka v následné komunikaci odpověděla na všechny položené otázky uspokojivě.

Proto navrhuji hodnocení diplomové práce Bc. M. Heczkové: výborně.



MUDr. Michal Vrablík, PhD.

V Praze 31. května 2010