

OPONENTSKÝ POSUDEK BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Autorka: Eliška Maršálková

Název práce: Optimalizace protokolu pro derivaci dendritických buněk z kostní dřeně a srovnání se slezinovými dendritickými buňkami

Vedoucí práce: Mgr. Jaroslava Lieskovská, Ph.D.

Eliška Maršálková předložila bakalářskou práci řešící optimalizaci protokolu pro derivaci dendritických buněk (dále uváděny pod zkratkou DCs odvozenou z anglického názvu „dendritic cells“) z kostní dřeně a jejich srovnání s DCs získaných ze sleziny. Řešená problematika je z vědeckého pohledu velmi zajímavá a aktuální, neboť DCs je v současné době věnována vysoká pozornost a výsledky z této práce mohou být dále využity k řadě dalších experimentů.

Předložená práce má rozsah 34 stran a svou strukturou a grafickou úpravou vyhovuje (s jednou drobnou výjimkou, viz dále) požadavkům vyplývajícím z Opatření proděkanky pro studium č. P1 o předkládání bakalářských a diplomových prací na Přírodovědecké fakultě JU ze dne 15. 4. 2011. Práce úspěšně prošla testem pro odhalování plagiátů mezi závěrečnými pracemi (Theses.cz), lze ji tedy považovat za originální práci autorky. Práce má klasické členění kapitol a je psána srozumitelnou češtinou s únosným množstvím překlepů a gramatických chyb.

V úvodu se autorka zabývá teoretickou částí problematiky a podává literární rešerši, která čítá celkem 9 stran. Tato rešeršní část se poměrně do hloubky zabývá popisem a funkcí DCs, následuje pak až příliš detailní přehled jedné skupiny receptorů DCs, tzv. toll-like receptorů. Naopak v úvodní části není literárně zmíněn přehled exprese vybraných receptorů (CD znaků) imunitními buňkami a zdůvodnění, proč k ověření čistoty získaných DCs byly použity zvolené CD znaky. Zároveň zde postrádám zasazení zvoleného tématu do kontextu s poznatky známými z literatury a alespoň minimální přehled výsledků experimentů na podobné téma.

Metodická část je zpracovaná velmi stručně (někdy až příliš na úkor srozumitelnosti) a s řadou formálních nedostatků (viz dále), avšak i přesto podává poměrně ucelený přehled o metodických postupech a používaných metodách.

Kapitola Výsledky je přehledně a logicky členěna dle daných cílů práce. Celkem tato kapitola čítá 11 stran a obsahuje 16 přehledných grafů a 8 tabulek, místy jsou však výsledky místo popisu už rovnou diskutovány.

Diskuzní část má rozsah 2 a půl strany, nicméně celá první strana se zabývá téměř výhradně literárním přehledem exprese vybraných CD znaků na imunitních buňkách (a přesně tato část v úvodu chybí), výsledky jsou tak diskutovány pouze na necelých dvou stranách (nepočítaje diskuzní části v kapitole Výsledky). Výsledky jsou však zde dány do kontextu s dostupnými poznatky z literatury a sporné body logicky vysvětleny.

Závěrečná část shrnuje získaná experimentální data a takto odpovídá na stanovené cíle. Kapitola týkající se použité literatury obsahuje 33 pramenů, z nichž 5 je českého původu. Seznam literatury je psán jednotným stylem (s drobnými chybami) a odpovídá požadavkům kladeným na vědeckou práci.

K formální stránce práce mám dále několik poznámek a doporučení:

- i. Dle Opatření proděkanky pro studium č. P1 o předkládání bakalářských a diplomových prací na Přírodovědecké fakultě JU ze dne 15. 4. 2011 má kapitola Úvod začínat na str. 1, ve Vaší práci však na str. 1 je uveden Seznam zkratek.
- ii. Seznam zkratek na str. 1 je neúplný (chybí např. PBS, BOFES, EDTA), část zkratek je vysvětlena pouze anglickým názvem, část pouze českým (navzdory tomu, že zkratka plyne z angl. názvu). Naopak některé zkratky se vyskytují pouze v seznamu, nikoliv pak v textu (např. FCS). V textu pak některé zkratky nejsou vysvětleny při prvním znění (s tím, že někdy jsou vysvětleny až při druhém znění, někdy však nejsou zkratky vysvětleny vůbec).

- iii. V rešeršní části je příliš často citováno z učebnic, review a jiných nepůvodních pramenů. Minimálně u některých tvrzení by bylo vhodné dohledat originální práci či vycházet z více nezávislých zdrojů.
- iv. V úvodní části chybí za řadou odstavců uvedené citace (str. 2 – odstavec DCs, str. 6 – odstavec Funkce DCs, aj.). Přestože se jedná o poměrně obecné znalosti, v jakékoliv odborné práci by vždy měl být uveden zdroj těchto informací.
- v. V práci jsou velmi často uváděny nespisovné laboratorní názvy používané pouze v hovorovém jazyce (str. 12 – centrifugačka, str. 16 – krmení buněk, aj.)
- vi. V metodické části práce postrádám vysvětlení zkratk u řady reagensů (PBS, EDTA, BOFES). Ačkoliv se jedná o široce používané reagensy, jejich vysvětlení a případné složení či pH by v práci mělo být uvedeno. Stejně tak vysvětlení těchto zkratk při jejich prvním použití v textu.
- vii. V metodické části týkající se průtokové cytometrie nejsou vůbec uvedeny jednotlivá emisní spektra použitých značených protilátek, stejně tak není nikde uvedeno nastavení přístroje pro měření.
- viii. Místo velmi často používaného termínu „buňky přečištěné na koloně“ (str. 22, 28, aj.) doporučuji spíše používat termín „buňky přečištěné magnetickou separací“.
- ix. Symbol pro odstředivou sílu „g“ by měl být uveden v kurzívě, znakem „g“ bez kurzívy se označují gramy.
- x. U všech grafů zobrazujících statisticky významné výsledky je znak statistické významnosti („*“) uváděn přímo ve sloupci zobrazujícím naměřená data, správně by měl být uveden nad směrodatnou odchylkou.
- xi. Na str. 22 a 23 jsou přehozeny popisky tabulek a text výsledků je zčásti vztahován ke správným hodnotám a zčásti k hodnotám přehozeným.

K předložené práci mám několik dotazů a žádám autorku o jejich zodpovězení při ústní obhajobě:

1. V práci je několikrát uvedeno tvrzení (např. str. 2, 6, aj.) „jen DCs (jakožto APCs) jsou schopné aktivovat naivní T lymfocyty“. Dosud však byly považovány jako APCs se stejnou funkcí též makrofágy a částečně i B lymfocyty. Pokud jsou dle nejnovějších poznatků DCs skutečně jedinými APCs s touto funkcí, doložte správnost tohoto tvrzení relevantními citacemi.
2. Na str. 4 uvádíte tři rozdílné typy DCs dle původu (folikulární, myeloidní a lymfoidní). Liší se myeloidní a lymfoidní DCs vedle původu i svou funkcí? Doložte Vaši odpověď relevantními citacemi.
3. Na str. 6 uvádíte rozdíl mezi MHC I a MHC II při prezentaci antigenu. Nicméně dle Vašeho popisu není v zásadě vidět rozdíl mezi MHC I a MHC II (prakticky jste jinými slovy popsala totéž u obou subtypů MHC). Uveďte tuto nesrovnalost na pravou míru.
4. Na str. 12 uvádíte, že buňky získané z kostní dřeně byly nejprve rozsuspendovány v tzv. MEM médiu, ale pak pro derivaci DCs z kostní dřeně už byly tyto buňky kultivovány v tzv. RPMI médiu (samozřejmě s dalšími přísadami). Z jakého důvodu byly buňky rozsuspendovány nejprve v jiném médiu, než ve kterém pak probíhala derivace?
5. Na str. 12 uvádíte, že do média používaného už pro derivaci DCs z kostní dřeně byla vedle jiného přidána také chemikálie 2-ME. Tato zkratka však není nikde v práci vysvětlena. Objasněte tento pojem a uveďte, proč se tato chemikálie do kultivačního média přidává.
6. V exp. 5.2 (Porovnání DCs izolovaných ze sleziny a derivovaných z kostní dřeně) jste ke stimulaci používala vedle LPS (lipopolysacharid) také ligandy LTA (lipoteichoic acid) a IQ (imiquimod). Nikde v práci však není uveden sebemenší detail o těchto ligandech (LPS, LTA, IQ). Uveďte základní vlastnosti těchto ligandů, kde se ligandy nachází a jaké toll-like receptory aktivují. Rovněž upřesněte, proč pro Vaše experimenty byly použity právě tyto konkrétní ligandy. Doložte Vaše odpovědi relevantními citacemi.

7. V kapitole týkající se získaných dat uvádíte řadu výsledků pouze formou tabulky, která však působí dosti nepřehledně (navíc zde není dodržen jednotný formát čísel). Nebylo by vhodnější prezentovat získaná data v podobě grafu? Navíc v těchto tabulkách nejsou nikde uvedeny směrodatné odchylky, proč tomu tak je? Na str. 16 uvádíte, že vzorky byly měřeny v triplikátech.
8. U žádného z grafů není uvedeno, jaká byla hladina významnosti a k čemu byly příp. statisticky významné hodnoty porovnávány. Doplňte tyto údaje.
9. Na str. 19 v obr. 8 máte uvedeno, že v obou případech derivace DCs (buď pouze pomocí GM-CSF či GM-CSF v kombinaci s IL-4) bylo zvýšení hladiny IL-10 statisticky významné u DCs stimulovaných LPS oproti nestimulovaným (tedy předpokládám, že porovnávány byly hodnoty u stimulovaných a nestimulovaných buněk, v práci tento fakt uveden není). V druhém případě (derivace pomocí GM-CSF v kombinaci s IL-4) je z graficky zobrazených dat jasně patrné, že stimulace DCs pomocí LPS nemohla signifikantně zvýšit hladinu IL-10 už díky velmi vysokým odchylkám. Uveďte tuto nesrovnalost na pravou míru.
10. Na str. 19 v obr. 9 nejsou uvedeny směrodatné odchylky. Byl tento experiment prováděn v triplikátech?
11. Na str. 20 a 21 popisujete vliv objemu vyměněného média na čistotu derivovaných DCs. V tomto experimentu jste pro optimalizaci zvolili buď 100% nebo 70% výměnu média. V ostatních experimentech (exp. týkající se derivace DCs z kostní dřeně pomocí samotného GM-CSF či GM-CSF v kombinaci s IL-4 a exp. zabývající se porovnáním čistoty DCs získaných z kostní dřeně a ze sleziny) jste však vyměňovali pouze 50% média. Z jakého důvodu byla zvolena tato hodnota, i když vůbec nebyla zařazena do optimalizačního experimentu?
12. Na str. 27 uvádíte „Když opomeneme vývojově nepříbuzné folikulární dendritické buňky (TEW et al., 1997), jsou si všechny dendritické buňky podobné hlavně společnou expresí molekul CD11c, CD80, CD86 a MHCII.“ Z obr. 2 na str. 5 však plyne, že tzv. plazmocytoidní DCs, tedy DCs odvozené od lymfoidní linie, jsou však CD11c negativní. Uveďte tuto nesrovnalost na pravou míru.

Ačkoliv předložená práce obsahuje řadu nedostatků zejména formálního rázu, je nezbytné vyzdvihnout fakt, že obsahuje poměrně rozsáhlou experimentální část. Z práce je patrné, že si autorka již v bakalářském stupni studia osvojila základy práce v laboratoři, zvládla řadu metodických postupů včetně tkáňových kultur a v praxi se seznámila s problematikou imunologie. Proto práci **doporučuji k obhajobě na Přírodovědecké fakultě Jihočeské univerzity.**

V Českých Budějovicích dne 20. 5. 2014

RNDr. Marie Jalovecká