

Oponentský posudek na bakalářskou práci Michaely Kubíčkové „Optimalizace *in vitro* metod studia adheze leukocytů“.

Bakalářská práce Michaely Kubíčkové má klasické členění a rozsah 44 stránek. Její úvodní rešeršní část je velmi dobře napsaná, je srozumitelná a přehledná. Chybí zde však informace o systému, který byl v podstatě studován a to o β 1 integrinech, proteinech extracelulárního matrix a jejich interakcích. To je zmíněno jednou větou až v diskuzi.

V části metodické je poněkud nepřehlednou část 3.2.6. „Adheze *in vitro*“. Informace o odebrání určitého množství buněk + 10% není jasná. Není jasné, jaká byla koncentrace fluorescenční sondy Calcein-2AM, v čem byla rozpuštěna, zda po inkubaci následovalo promytí. Podobné informace nejsou dostupné ani u jiných bodů. Co se týče proteinů ECM, tak je zde sice odkaz na výsledky, zde se však dozvíme sice koncentrace, ale doba coatingu a rozpouštědlo mi nejsou jasné. Taky není jasné, v čem byl rozpuštěn PMA a zda po jeho expozici bylo provedeno promytí. Velmi prospěšné by bylo přehledné a úplné schema protokolu A a B. Přiložená tabulka, která deklaruje srovnání protokolů ukazuje jen rozdíly v krocích, ale ignorováním časové následnosti nelze hovořit o protokolech, což vede k desorientaci. Co se týče vyhodnocení, lze se domnívat, že jsou srovnávány adheované buňky bez promytí s adheovanými buňkami po jednotlivých promytích (respektive jejich fluorescenční signály), ale toto by mělo být přesně deklarováno.

Co se týče optimalizace metody, přivítal bych informaci o tom, jak byla zajištěna reprodukovatelnost promytí (promývačka, typ). Metodická optimalizace je provedena na neutrofilech, přesto se koncem práce pracuje s mononukleárními buňkami a makrofágy, někde (v diskuzi) by toto mělo být zdůvodněno, obhájeno. Kladně hodnotím rozsáhlejší popis obrázků umožňující čtení práce „přes obrázky“. Nicméně mi v popisu chybí interpretace značení statistické významnosti. Hvězdičky jsou jen symbolem, kterému je třeba vždy přisoudit odpovídající hladinu významnosti. V části 4.3 chybí u optimalizace doby inkubace inhibitorů s buňkami informace o jejich koncentraci. Tato otázka je sice řešena dál, ale i v tomto bodu by ji bylo třeba uvést. Pro různé doby inkubace inhibitorů s neutrofilů by bylo vhodné mít odpovídající PMA kontroly, aby se vyloučil efekt působení času, ale to spíše pro budoucí studie, pro zavedení metody to nebylo nutné.

V části diskuze jsou výsledky především shrnuty. Chybí mi větší srovnání s literaturou a především diskutování zjištěných poznatků, kterých byla v oblasti jako metodického zavádění tak testování klíčících inhibitorů proteáz získána celá řada. Je mi jasné, že pro vysvětlení pozorovaných jevů není dostatek podkladů, přesto by bylo dobré se alespoň pokusit o vysvětlení nebo navrhnout cesty, které by vedly k objasnění těchto jevů.

V seznamu literatury jsou názvy časopisů někdy kurzívou, někdy normálním písmem. Někdy jsou v názvech časopisů všechna písmena velká, jinde ne. Názvy časopisů jsou plné, přesto v jednom případě jsou použity zkratky. Třeba dbát i na takové detaily, jako je jednotné používání mezer za tečkou apod.

K práci mám tyto otázky:

Proč byl použit PMA pro aktivaci studovaných buněk a ne cytokiny, jako např. GM-CSF v kombinaci s $\text{TNF}\alpha$ u neutrofilů? Jak si vysvětlujete, že PMA snižuje adhezi makrofágů?

Jakou máte představu inhibice adheze leukocytů pomocí inhibitorů proteáz? Máte vysvětlení, proč mohl PMA přestat fungovat po určité experimentální periodě?

Domníváte se, že měření fluorescence adherovaných buněk odráží spolehlivě jejich počet? Nezkoušela jste prověřit linearitu závislosti fluorescenčního signálu na počtu adherovaných buněk?

Cílem následné práce je zřejmě další studium vlivu klíčtčích inhibitorů na adhezi leukocytů a tím ovlivnění jejich transmigrace. V těchto procesech hrají roli, jak sama uvádíte, kromě selektinů integriny LFA-1, VLA-4, Mac-1 atd. a jejich interakce s odpovídajícími ligandy (ICAM-1, VCAM-1 atd.).

Zaměřujete se na interakce s proteiny extracelulární matrix, které se samozřejmě na těchto procesech taky spolupodílejí. Chtěl bych se zeptat, do jaké míry jsou použité proteiny vhodné jako model pro studium adheze lymfocytů a ovlivnění leukocytární transmigrace?

Účelem bakalářské práce je obecně seznámit se s dostatečným množstvím metod a jejich použitím a získat poznatky prospěšné pro laboratoř a případně pro další pokračování výzkumu ve formě magisterské práce. Dalším cílem je přimět studenta k tomu, aby své výsledky dokázal dobře prezentovat a diskutovat. S prvními dvěma úkoly se Michaela Kubičková vypořádala více než dobře. K poslednímu úkolu jsem měl pár připomínek, míněných spíše jako na upozornění na to, s čím je možno se v budoucnu, třeba při obhajobě magisterské práce, setkat a čeho je dobré se vyvarovat.

Práci zatím hodnotím stupněm 1-2 s tím, že se v případě dobré prezentace a průběhu obhajoby ke stupni 1 rád přikloním.



RNDr. Jan Ženka, CSc.

V Českých Budějovicích 12.5.2016