

Posudek na diplomovou práci

Název práce: Vliv klíštěcích slin na interakce mezi spirochetami *Borelia afzelii* a myšimi dendritickými buňkami

Autor: Bc. Martina Slámová

Tato diplomová práce je zaměřena na roli dendritických buněk v obranných reakcích hostitele proti infekci *Borelia afzelii* se zřetelem na působení klíštěcích slin.

Úvod/Literární přehled na 9 stranách shrnuje základní poznatky o studované chorobě, o imunitních reakcích hostitele vůči boreliím i na sání klíštěte, ale také poznatky o únikových mechanismech borelií a klíšťat. Jednotlivé kapitoly na sebe logicky navazují a jsou napsány čtivým vědeckým jazykem. Na mnoha místech však chybí citace a časté jsou překlepy v latinských jménech. Kapitola 1.4 Imunitní odpověď na sání klíštěte a kapitola 1.5 Efekt slin na modulaci imunitní odpovědi jsou pak nejslabší částí literárního přehledu, přestože jsou stěžejní pro experimentální část práce. Kapitola 1.4 je založena na pouhých 4 citacích, z čehož nejnovější je z roku 1998. Poslední kapitola pak působí na čtenáře spíše dojmem náhodně poskládaných poznámek než uceleného textu.

Na str. 7 autorka píše, že první buňky nespecifické imunity, které se dostanou do místa infekce, jsou monocyty. Jakou roli při infekci boreliemi hrají neutrofilové a kdy se dostávají do místa infekce?

V předposledním odstavci úvodu (str. 13) autorka zmiňuje nevíremický přenos patogenů jako nepřímý důkaz SAT efektu. Jakým termínem se v odborné literatuře označuje jev, kdy k takovému přenosu dochází?

V posledním odstavci kapitoly 1.5 (str. 13) by bylo vhodné uvést přesné a správné druhové jméno parazita i přenašeče v rámci citace práce Titus a Ribeiro (1988).

Cíle práce jsou jasně definované ve třech bodech a odpovídají kapitole výsledky.

Materiál a metodika jsou podrobně a přehledně rozepsané na 5 stranách, přesto zde chybí několik informací důležitých pro opakování pokusů v budoucnu; pro centrifugaci jsou v textu uváděny pouze otáčky, ale už ne použitý rotor a centrifuga; lepší by bylo uvádět univerzálnější hodnotu zrychlení. V kapitole 3.2.6 Stanovení cytokinů autorka píše, v jakém poměru ředila protilátky, ale už neudává důležitější informaci, a to výchozí či konečnou koncentraci protilátek a avidin-peroxidázy.

Na str. 19 v kapitole 3.2.8 Statistické vyhodnocení dat autorka uvádí, že pokusy byly prováděny v triplicacích. Nikde jsem však nenašla údaj, kolikrát byly pokusy opakovány. Kolik nezávislých měření jste prováděla? Na kolika myších byly pokusy dělané?

V kapitole 3.2.5. autorka popisuje metodu měření proliferace T-lymfocytů. Jakou jinou metodu lze ještě použít pro měření míry proliferace buněk a která z těchto metod je přesnější?

Výsledky experimentů jsou zpracované na 7 stranách a doplněny 9 přehlednými grafy, u kterých však chybí informace, co představují chybové úsečky. Kapitola 4.2 je trochu matoucí a čtenář získá jasnější představu o tom, jak pokus vypadal, až z popisku grafu (graf č.2).

V kapitole 4.1 Vliv slin na procento fagocytujících buněk byly použité dendritické buňky předem nějak aktivovány nebo preinkubovány se slinami? Co bylo v tomto případě kontrolou?

Kapitola 4.2 Vliv slin na produkci cytokinů dendritickými buňkami: měli jste v těchto pokusech i kontrolu DC+B+pil-4h?

Grafy 8 a 9: jak si autorka vysvětluje produkci IL-2/proliferaci u kontrolních T-lymfocytů? Liší se významně produkce IL-2/proliferace mezi skupinami K a T? Jak by vyšly statistické rozdíly v produkci IL-2/proliferaci, pokud by kontrolou byla skupina K? Měli jste v pokusech s T-lymfocyty pilokarpinovou kontrolu?

Kapitola **diskuze** je vzhledem k množství získaných výsledků velmi krátká, pouhé 2 stránky. Navíc v prvních dvou odstavcích diskuze (str. 27) zcela chybí jakákoliv citace. Přesto autorka prokázala schopnost zasvěceně porovnat získaná data s publikovanými údaji.

Na straně 27 autorka píše, že „Z našich pozorování plyne, že spirochety jsou hojně fagocytovány naivními dendritickými buňkami a poté zpracovány na menší fragmenty“. Z jakých pozorování vyplývá ono zpracování na menší fragmenty?

Na straně 27 autorka dále uvádí, že sliny klišťat inhibovaly fagocytózu borelií dendritickými buňkami. Jaké jiné okolnosti obecně mohou vést k inhibici fagocytózy?

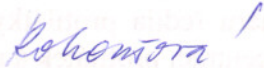
Co bylo důvodem k porovnání buněk preinkubovaných versus inkubovaných se slinami? A co bylo výsledkem tohoto porovnání?

Citovaná literatura obsahuje přes 100 citací původních prací i literárních rešerší, seznam je přehledný s jednotným formátem.

Závěr:

Práce je i přes drobné překlepy pečlivě zpracovaná, logicky uspořádaná, s kvalitní grafickou úpravou. Svým rozsahem a obsahem práce splňuje podmínky kladené na diplomovou práci, a proto ji doporučuji k obhajobě. Samotnou práci pak hodnotím stupněm velmi dobře.

Liptovský Ján
24. května 2010


RNDr. Iva Rohoušová, Ph.D.

Oponentský posudek diplomové práce Bc. Martiny Slámové: **Vliv klíštěcích slin na interakce mezi spirochétami *Borrelia afzelii* a myšními dendritickými buňkami**

Předkládaná diplomová práce si klade za úkol studium interakcí spirochét Lymeské boreliózy s dendritickými buňkami a ovlivnění těchto interakcí slinami klíštěte *Ixodes ricinus*. Vyhodnocován je vliv slin na fagocytózu borelií dendritickými buňkami, na produkci cytokinů těmito buňkami po stimulaci boreliemi a také na jejich schopnost aktivovat specifické CD4+ T-lymfocyty.

Práce v rozsahu 37 stran má obvyklé členění, literárnímu přehledu je věnováno 13 stran, materiálu a metodice 5 stran a výsledkům 7 stran. Diskuze společně se závěrem zaujímá 3 strany, přehled použité literatury obsahuje 113 citací. Přílohou je fotografie dendritické buňky fagocytující borelie vizualizované pomocí imunofluorescence.

Úvodní část je napsána velmi čtivě a je z ní zřejmé, že autorka dobře ovládá jak samotnou práci s informacemi získanými z literatury, tak si dokáže dobře poradit s překlady z angličtiny. Práce, ze kterých čerpala, jsou velmi aktuální, pouze do kapitoly Imunitní odpověď hostitele na sání klíštěte by se hodilo zařadit některé čerstvější informace, například existenci T-regulačních lymfocytů nebo Th17 subpopulace.

Úvod ale bohužel obsahuje, stejně jako ostatní části práce, velké množství formálních chyb, nepřesných citací a nejednotného používání mezer, díky nimž působí práce trochu „odbytě“. Je třeba pohlídat si, aby citace publikací v textu měly jednotnou formu. Když má publikace dva autory, uvádějí se oba se spojkou a, příp. and, má-li autorů víc, píšeme jméno prvního a kol., příp. et al. Déle mezi hodnotou a příslušnou jednotkou je třeba psát mezeru, stejně tak jako před procenty, nemyslíme-li tím „procentní“, ale počet procent. Také by bylo vhodné psát názvy proteinů česky (dekorin, fibronektin), nebo alespoň psaní těchto názvů sjednotit. Našla jsem i několik úsměvných chyb z nepozornosti, např.: „Extrakt ze slinných žlaz *Dermacentor reticulatus* sajících na klíštěti 6 dní“.

Cíle práce jsou stanoveny přehledně ve třech bodech.

Kapitola materiál a metody je svým rozsahem úměrná velkému množství metod, které byly v práci využity. Popisy metod jsou dostatečné a mohou tedy sloužit jako návod pro další studenty. Martina musela zvládnout náročné metodiky, především izolaci dendritických buněk a práci s nimi, kultivaci borelií a zacházení s infekčním materiálem, ale také imunoenzymatické metody sloužící k detekci nejrůznějších cytokinů.

Výsledková část, která je napsána stručně a přehledně, je vhodně doplněna devíti grafy. Provedené experimenty z části navazují na práci Martininy školitelky specialistky Anny Fialové-Skallové. V nich Anna prokázala inhibici migrace a maturace dendritických buněk vlivem slin *I. ricinus* a také ovlivnění dendritickými buňkami zprostředkované proliferace a polarizace naivních CD4+ T-lymfocytů. Martina ke svým pokusům místo naivních transgenních SMARTA-2 T-lymfocytů využívala paměťové T-lymfocyty specifické k antigenům borelií, vyizolované z myši infikované boreliemi. Dendritické buňky ovlivněné slinami klíštět pak stimulovala přidáním borelií a pozorovala vliv slin na reaktivaci paměťových T-lymfocytů. Využila tedy modelu z předchozí práce a dobrým designem pokusů ho přiblížila situaci nastávající po infekci spirochétami Lymeské boreliózy. Ze získaných výsledků vyplývá, že ovlivnění boreliemi stimulovaných dendritických buněk slinami má i při reaktivaci paměťových T-

lymfocytů specifických k antigenům borelií velký význam, což je velice zajímavé. Navíc Martina prokázala inhibiční vliv slin na produkci cytokinů dendritickými buňkami inkubovanými s boreliemi i na samotnou fagocytózu spirochét dendritickými buňkami.

Vysokou kvalitu a rozsah získaných výsledků však Martina nedokázala v diskuzi příliš dobře „prodat“. Diskuze je krátká (společně se závěrem zaujímá jen 2,5 strany) a chybí mi v ní hlavně porovnání dosažených výsledků s výsledky Martininy školitelky specialistky Anny Fialové-Skallové (Skallová et al. 2008). Martina svou práci na její práci navazovala, proto mě velmi zajímalo, jaký bude rozdíl mezi prezentací antigenů naivním a paměťovým T-buňkám a také jak se v těchto interakcích projeví rozdílný aktivátor dendritických buněk.

Přestože většina zkratk je vysvětlena v textu, uvítala bych seznam použitých zkratk, který by usnadnil orientaci v použitých termínech.

K předkládané diplomové práci mám tyto dotazy a připomínky a prosím Martinu o reakci na ně:

1. Str. 7: Jako pozdní stádium neléčené infekce u všech tří hlavních původců Lymeské boreliózy (*B.burgdorferi sensu stricto.*, *B.afzelii.*, *B.garinii*) je uvedena neuroborelioza. Je tomu opravdu tak, když *B. burgdorferi s.s.* napadá hlavně klouby (chronická artritida) a *B. afzelii* je spojována převážně s kožními projevy (acrodermatitis chronica atrophicans-ACA)?
2. Str. 9: V kapitole úloha dendritických buněk by, myslím, bylo užitečné popsat cytokiny, které jsou dendritickými buňkami produkovány a jejich role v další imunitní odpovědi. Vysvětlilo by to zároveň, proč si Martina vybrala do experimentální části sledování produkce zrovna tři uvedených cytokinů.
3. Interleukin 6 je v práci uváděn na různých místech jako Th2 cytokin (str. 11) a jako Th1 cytokin (str. 28). Jakou roli tedy hraje IL-6 u dendritických buněk v imunitní odpovědi na boreliovou infekci?
4. Str. 15: Jak byly získány samice *I. ricinus* použité k získání slin? Pocházely z chovů, nebo byly odchyceny v přírodě?
5. Str. 16: Byla u izolovaných dendritických buněk a CD4+T-lymfocytů kontrolována viabilita pomocí roztoku Trypanové modři?
6. Str. 18: „Standard byl dvojkovou řadou ředěn až na nulovou koncentraci...“ Bylo použito 7 bodů kalibrační křivky a negativní kontrola s ředícím roztokem?
7. Str. 19: Statistické vyhodnocení dat. Shrnují grafy data z několika pokusů, nebo jde vždy o výsledky reprezentativních pokusů?
8. Str. 20: V grafu 1 chybí popisek osy Y (mělo by být uvedeno, čeho se „%“ týkají). Také si myslím, že by bylo lepší vysvětlit zkratky používané v popiscích osy X v legendě pod grafem, přestože zkratky jsou poměrně intuitivní.

9. Str. 22: V grafu 4 (vliv slin na produkci IL-10 dendritickými buňkami) opravdu vyšel rozdíl mezi skupinami DC+B a DC+B+S po 48 hodinách průkazný? Na jaké hladině významnosti?
10. Str. 22: Čím si vysvětlujete, že zatímco produkce TNF- α a IL-6 po stimulaci dendritických buněk boreliemi prudce narůstá už po 24 hodinách a po 48 hodinách je prakticky totožná, produkce IL-10 má hlavní pík produkce až po 48 hodinách? Jakou roli hraje IL-10 u dendritických buněk v odpovědi na boreliovou infekci?
11. Str. 28: Nemůže pozorovaný vliv na proliferaci CD4+ T-lymfocytů způsobovat i snížená maturace dendritických buněk vlivem slin, tedy nižší exprese MHC II molekul i kostimulačních molekul B7-2, a tím snížená kapacita prezentovat antigen (Skallová et al. 2008)?
12. Str. 28: Do diskuze bych doporučovala zařadit i publikaci týkající se účinků sialostatínu L na dendritické buňky a následně na proliferaci antigen-specifických CD4+ T-lymfocytů (Sa-Nunes et al. 2009). Mohlo by se jednat o jeden z důvodů, proč je v Martinových pokusech inhibována restimulace paměťových T-lymfocytů.
13. Str. 38: Příloha. Jaké protilátky byly použity k vizualizaci dendritických buněk a borelií a jak byly ředěné? Při jakém zvětšení byly buňky fotografovány?

Přes uvedené výhrady si myslím, že práce prezentuje kvalitní původní výsledky, které budou základem pro publikaci. Splňuje tedy nároky kladené na diplomovou práci Přírodovědeckou fakultou Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích a **doporučuji** ji proto k obhajobě. Navrhuji klasifikovat ji známkou 2, ale nevylučuji vylepšení známky pěknou obhajobou.

V Plzni, dne 21. 5. 2010

RNDr. Kateřina Černá, Ph. D.