

Vliv vakcinace slinami klíštěte *Ixodes ricinus* na přenos *Borrelia burgdorferi* a cytokinový profil hostitele

Klíště obecné *Ixodes ricinus* patří mezi naše významné přenašeče infekčních onemocnění způsobených nejrůznějšími patogeny od bakterií, virů, prvoků až po červy.

K infekcím s vysokým výskytem na českém území patří především klíšťová encefalitida a lymeská borelióza. A právě spirocheta *Borrelia burgdorferi sensu lato* - původce lymeské nemoci – je patogen, kterému je od 80. let minulého století věnována velká pozornost nejen lékařské, ale také veterinární a zejména vědecké společnosti, která se zaměřila na vývoj ochranné vakcíny proti tomuto agens. Vzhledem k antigenní různorodosti jednotlivých druhů a zejména odlišné expresi povrchových proteinů, které se mění v závislosti na přírodním cyklu borelie, respektive životním cyklu klíštěte se doposud nepodařilo získat účinnou a bezpečnou vakcínu, a proto je pozornost výzkumu věnována nejen samotnému patogenu, ale také se obrací na jeho vektora a možnosti zamezení či znemožnění kvalitního sání na hostiteli, a tím i zabránění jeho nakažení přenášenými patogeny.

Diplomantka se ve své magisterské práci zaměřila na studium vlivu vakcinace myší, jako zvířecího modelu pro boreliózu, jednak slinami klíšťat a jednak opakovaným sáním nymf *Ixodes ricinus* na imunitní odpověď hostitele při současném přenosu spirochet *Borrelia burgdorferi*.

Předložená práce rozsahu 69 stran je psána velmi pečlivě, srozumitelným jazykem s minimem chyb a překlepů (str.10 ř. 7i v hostiteli, str.11 ř. 4ve vstupu do klíštěte/**hostitele?**, str.13 ř. 20 a str. 46 ř. 26 **in vitro**, str. 24 ř. 19.....vaccínu/**vakcínu**). Práce je klasicky členěna do jednotlivých kapitol.

Úvod je tvořen 25 stránkami, na kterých se čtenář seznamuje s tématem diplomové práce. Teoretický přehled pečlivě a podrobně zpracovává biologii, patogenitu, antigení povrch během životního cyklu zmiňovaného patogena a jeho přenašeče, jejich interakce mezi sebou a hostitelem. Velmi přehledně jsou zde prezentovány také klinické projevy, imunitní odpověď a terapie lymeské nemoci. Značnou pozornost diplomantka věnuje „trans-block“ vakcínám, které by mohly zabránit přenosu patogenů při sání klíšťat.

Cíle práce jsou stanoveny jasně a jednoznačně.

Z kapitoly Materiál a metody je patrné, že autorka zvládla širokou škálu laboratorních technik od práce s laboratorními zvířaty, manipulace a kultivace borelií až po čistě molekulární metody izolace a detekce DNA.

Z výsledkové části této práce je zřejmé, že se na zvoleném zvířecím modelu diplomantce nepodařil prokázat vliv imunizace myší opakovaným sáním nymf klíštěte *Ixodes ricinus* na jejich přežívání ani na přeměnu do dalších stádií. A také nebyl zaznamenán významný vliv na vytvoření rezistence k přenosu *Borrelia burgdorferi* a rozvoji infekce. Nadějnějšími se jeví výsledky z imunizace myší přímo slinami odebranými z klíšťat, kde byl pozorován rozvoj humorální imunitní odpovědi myšího hostitele vůči slinám klíštěte a potlačení SAT efektu při (slinami aktivovaném) přenosu spirochet.

V diskuzi jsou kriticky zhodnoceny dosažené výsledky v konfrontaci s literaturou. A nejen této část diplomové práce je zpracována velmi pečlivě.

Měla bych na autorku několik dotazů:

- ✓ Proč jste si pro své experimenty vybrala právě kmen myší C3H/Hen?
- ✓ Čím si vysvětlujete rozdíl v imunizaci opakovaným sáním nymf na jedné straně a slinami klíšťat na straně druhé?
- ✓ Jaký význam pro rozvoj infekce *Borrelia burgdorferi* má polarizace imunitní odpovědi hostitele k Th2 subpopulaci T lymfocytů?

Autorka sepsáním této práce dokázala, že je schopna samostatně pracovat s vědeckou literaturou, plánovat a provést experimenty a vyhodnotit získané výsledky. Předloženou magisterskou práci Bc. Evy Gregorové považuji po stránce formální a obsahové za spis, který splňuje standardní požadavky kladené na diplomové práce na Přírodovědecké fakultě Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích. Práci doporučuji k obhajobě a po jejím úspěšném absolvování ji hodnotím stupněm výborným.

V Českých Budějovicích, 18.5.2011.

Paulína Tínavská

RNDr. Pavlína Tínavská, PhD.

**Posudek na diplomovou práci Bc. Evy Gregorové:
„Vliv vakcinace slinami klíštěte *Ixodes ricinus* na přenos *Borrelia burgdorferi* a
cytokinový profil hostitele“**

Předložená práce se zabývá tematikou imunitní odpovědi hostitele na opakované sání klíštěte a ovlivnění slinami aktivovaného přenosu borélií. Tato problematika je již dlouhodobě řešena na pracovišti školitele a představuje jeden z mnoha přístupů při studiu interakcí vektor-hostitel.

Diplomová práce je tradičně rozdělena do hlavních kapitol úvod, cíle práce, materiál a metody, výsledky, diskuze, závěr, seznam zkratk a literatura, které obsahují celou řadu podkapitol. Celkový rozsah práce činí 69 stran.

Úvodní část diplomové práce je zpracována precizně a je věnována biologii klíšťat, jimi přenášených onemocnění se zaměřením na Lymfskou boreliózu a interakcemi mezi hostitelem a klíštětem, klíštětem a boréliemi a boréliemi a hostitelem s důrazem na mechanismy obrany klíštěte proti imunitní odpovědi hostitele pomocí nichž klíště usnadňuje přenos borélií.

Cíle práce jsou jasně formulovány do čtyř dílčích bodů, zabývajících se vakcinací hostitele (myši) opakovaným sáním klíšťat nebo extrahovanými slinami klíšťat, monitorování přenosu borélií a vyhodnocení imunitní odpovědi hostitele.

Kapitola materiál a metody obsahuje soupis všech hlavních postupů a metod používaných během experimentů včetně detailních popisů jednotlivých provedených experimentů.

Výsledky jsou podrobně zpracovány, rozděleny do dvou hlavních podkapitol podle metody prováděné vakcinace a dokumentovány devíti grafy, z nichž dva jsou složené. Grafy přehledně shrnují slovy psané výsledky, nicméně použití tří různých stimulantů (LPS, ConA, PHA+PMA) dosti znepráhledňuje výsledky a znesnadňuje jejich interpretaci. Navíc statistické vyhodnocení výsledků bylo prováděno pouze ve srovnání s kontrolními skupinami, tudíž jakékoli konstatování o poklesu či nárůstu produkce interleukinů/počtu borélií je zavádějící s ohledem k velikosti směrodatných odchylek.

V diskuzi autorka konfrontuje své výsledky vlivu vakcinace sáním klíšťat či slinami jak s domácí, tak zahraniční literaturou.

Souhrn je jasně a přehledně formulován a prakticky odpovídá stanoveným cílům práce.

Je nutno zdůraznit, že v předložené diplomové práci se vyskytuje pouze několik formálních chyb ve formě překlepů a pravopisných chyb.


K autorce mám několik věcných dotazů:

- 1. Čím si autorka vysvětluje úhyn myši po opakované vakcinaci BSA? Byla snad zvolená dávka 10 μ g moc vysoká nebo svou roli sehrálo Freundovo adjuvans? Použité schéma vakcinace si autorka zvolila sama, nebo vycházela z literárních zdrojů jiných autorů?**
- 2. V kapitole Materiál a metody postrádám zdůvodnění výběru zmíněných stimulantů. Proč byly vybrány zrovna tyto tři a proč byly použity současně, přičemž se autorka k rozdílným výsledkům dosaženým při použití těchto stimulantů nikde nevyjadřuje?**
- 3. Proč byla přítomnost borélií ve vnitřních orgánech sledována právě v srdci a močovém měchýři?**

Závěr: Přes výše uvedené připomínky a výtky považuji předloženou diplomovou práci za zdařilou, splňující vytyčené cíle. Svědčí o schopnosti autorky pracovat s vědeckou literaturou, plánovat, provádět i vyhodnocovat experimenty a ze získaných výsledků vyvozovat závěry. Výsledky diplomové práce Bc. Evy Gregorové doplňují a rozšiřují výsledky studií a experimentů prováděných v laboratoři interakcí vektor-hostitel.

Předložená diplomová práce Bc. Evy Gregorové splňuje veškeré požadavky kladené na diplomové práce na Přírodovědecké fakultě Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích a **doporučuji ji k obhajobě.**

V Českých Budějovicích, 16. 5. 2011


RNDr. Bohumil Sak, Ph.D.