

Oponentský posudek na magisterskou práci Bc. Šárky Koudelkové s názvem The utilisation of mast cells for exploration of immunomodulatory effects of tick salivary proteins

Předkládaná práce o rozsahu 46 stran sestává z úvodu, pojatého jako literární rešerše, vytyčení cílů práce, dále metodiky, výsledků a diskuze. Na konci je uvedeno stručné shrnutí, seznam referencí a zkratk. Rozsah jednotlivých oddílů je přiměřený a vyrovnaný.

To, že si autorka vybrala k sepsání anglický jazyk je chvályhodné, jelikož jedině aktivním používáním je možné se naučit správně psát vědecké publikace, používat vhodné termíny a obvyklá slovní spojení. To si musí ještě osvojit i autorka, přestože jinak se práce čte dobře a autorka má psanou angličtinu na velmi slušné úrovni.

V úvodu autorka detailně popisuje žírné buňky, jejich funkci, klasifikaci, způsoby aktivace a shrnuje, které mediátory mají žírné buňky k dispozici. Dále jsou shrnuty poznatky o úloze žírných buněk v různých onemocněních a v protiklíštěcí imunitě. Následuje také porovnání žírných buněk s bazofily, za jejichž tkáňovou obdobu byly žírné buňky považovány. Úvod je poměrně vyčerpávající, jelikož se ovšem práce zabývá porovnáním BMMC a MC/9, stálo by za to diskutovat s poukazem na literaturu, pro jaké účely se hodí ten či onen typ. **Jaký další typ primárních žírných buněk se ještě vedle BMMC používá v experimentech a jaké jsou jeho přednosti a nevýhody v porovnání s BMMC?**

Cíle práce jsou stanoveny jasně a jsou rozsahem adekvátní magisterské práci. Metody jsou popsány detailně tak, že by bylo možné podle nich experiment zopakovat. Měl bych poznámku k tabulce s receptem na Tyrode's buffer. Je vždy lepší v metodách uvádět molární koncentraci složek než hmotnost, která přijde do litru pufru. **Proč?**

Výsledky práce jsou velice zajímavé. Je vidět, že oba typy buněk se výrazně liší ve svých reakcích na použité stimuly, především na IgE. Poněkud mě zmátly obrázky 1 a 2, které pokud se nemýlím, používají stejná data, akorát jsou jinak prezentovány. To mi přijde zbytečné, matoucí a preferoval bych jeden obrázek s širším popisem a detailnějším značením statistické průkaznosti, např. * použít pro porovnání typů buněk a # pro porovnání typů aktivace. Protizánětlivý účinek propolisu na BMMC je také pozoruhodný, nicméně bych se rád zeptal autorky, **proč zrovna propolis a jak to souvisí se zadaným tématem?**

Použití klíštěcích slin ukázalo opět poměrně značné rozdíly v produkci cytokinů mezi oběma typy buněk, zatímco použití proteinu CPI nevedlo k výraznějším změnám v produkci cytokinů. Je zajímavé, že zatímco produkce cytokinů je výraznější po simulaci ionomycinem, degranulace je vyšší po stimulaci IgE. **Jak by to autorka vysvětlila?**

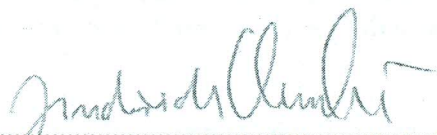
Diskuze se zabývá jednotlivými výsledky a diskutuje je s literaturou, nicméně mi chybí důkladnější porovnání MC/9 a BMMC jak na základě literatury, tak na základě vlastních pozorování a diskuze jejich použití v klíštěcím výzkumu. **Myslí si autorka, pokud pomine hledisko snadnější manipulace a levnější kultivace, že MC/9 jsou vhodným modelem pro pokusy s klíštěcími slinami či jednotlivými rekombinantními proteiny? Co může být důvodem nepřítomnosti IL-4 v MC/9 buňkách.**

Shrnutí by podle mě nemělo být pouhým konstatováním výsledků v kostce, ale mělo by mít spíš podobu závěru, tj. výsledky převedené do srozumitelnějšího jazyka. Například snížení IL-6, TNF (termín TNF- α se již nepoužívá) a zvýšení IL-10 by se dle mého dalo popsat jako „anti-inflammatory effect“. Chybí tu také závěr o tom, jaký typ buněk je vhodnější.

Celkově je práce na velmi dobré úrovni, autorka se během ní měla možnost naučit a zdokonalit imunologické laboratorní techniky, zacházet s poměrně specifickou populací leukocytů a také vyhodnocovat a interpretovat data.

Práci vřele doporučuji k obhajobě, a jelikož se obhajoby nebudu moci osobně účastnit, ponechám hodnocení na přítomné komisi.

V Drážďanech 10.1.2013



.....
RNDr. Jindřich Chmelař, PhD

Oponentský posudek na magisterskou diplomovou práci Bc. Šárky Koudelkové na téma:

The utilisation of mast cells for exploration of immunomodulatory effects of tick salivary proteins

Diplomantka si pro svou práci zvolila studium žírných buněk (mastocytů), které jsou jako jedny z prvních buněk nespecifické imunity aktivovány při zánětlivých procesech, mají důležitou sekreční funkci při obraně proti parazitům a nezanedbatelná je také jejich imunomodulační role. Na druhé straně jsou pak stejné mechanismy těchto buněk, které brání organismus před parazitární infekcí, zodpovědné za alergické reakce na neškodné antigeny.

Studentka si klade za cíl srovnání žírných buněk pocházejících z kostní dřeně myší a z *in vitro* buněčných kultur. Sleduje jejich cytokinový profil po aktivaci odlišnými stimuly a vliv zvolených proteinů a antigenů na produkci cytokinů těmito buňkami. Práce má charakter bazálního výzkumu, jehož výsledky jsou základem pro další úspěšné studium imunomodulačního vlivu proteinů ze slin klíšťat, jakožto ektoparazitů a vektorů nejrozličnějších infekčních agens.

Předložená magisterská práce rozsahu 46 stran je v angličtině, je psána čtivě a srozumitelným jazykem s minimem chyb a překlepů (na str. 4 došlo k záměně pojivových žírných buněk (MC_{TC}) za slizniční (MC_T) typ, který obsahuje pouze tryptázu. Na str. 9 a 16 bych pro latinské výrazy *in vitro* a *E. coli* použila raději kurzívu).

Práce je klasicky členěna do jednotlivých kapitol.

V literárním přehledu se čtenář blízce seznamuje s klasifikací myších a lidských žírných buněk, jejich vývojem, dozráváním a aktivací. Značná část tohoto přehledu je věnována jednotlivým mediátorům, které žírné buňky produkují. Podrobně je zde probrána role žírných buněk při ektoparazitární ataku (sání klíšťat). A nejsou vynechána ani onemocnění asociovaná s žírnými buňkami. Přes poměrně obsáhlý úvod mi v práci přeci jen chybí biologická charakterizace buněčné linie žírných buněk MC/9, které byly v této studii použity pro srovnání s žírnými buňkami z kostní dřeně myší.

Cíle práce jsou stanoveny jasně a jednoznačně.

Z kapitoly Materiály a metody je zřejmé, že autorka zvládla širokou škálu laboratorních technik, od manipulace se živými zvířaty, náročné a pečlivé práce s kulturami *in vitro* po základní i nadstavbové metody používané v imunologii.

Z výsledkové části této práce je patrné, že se diplomantce úspěšně podařila i experimentální část této práce. Domnívám se, že prezentované výsledky jsou dobrým

základním kamenem, pro další výzkum na poli imunomodulačního vlivu parazitů na hostitelský organismus.

Na autorku bych měla několik dotazů:

- 1) Jak byla určena efektivní koncentrace antigenů (proteinů) pro ovlivnění produkce sledovaných cytokinů žírnými buňkami?
- 2) Na základě čeho byl určen čas odběru pro stanovení jednotlivých cytokinů v supernatantu obou typů žírných buněk kultivovaných *in vitro*?
- 3) Proč nebyla testována také bazální hladina (cytokinové pozadí) jednotlivých testovaných cytokinů bez aktivace žírných buněk Ionomycinem či IgE?
- 4) Zkoušela jste také životaschopnost žírných buněk pocházejících z kostní dřeně po aktivaci IgE?

V diskusi, která je psána jasně a zasvěceně, diplomantka analyzuje získané výsledky v konfrontaci se světovou literaturou.

Autorka sepsáním této práce dokázala, že je schopna samostatně pracovat s vědeckou literaturou, plánovat a provést experimenty, porovnat a vyhodnotit získané výsledky. Předloženou magisterskou práci Bc. Šárky Koudelkové 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.

V Českých Budějovicích, 14.1.2013.

RNDr. Pavlína Tinavská, PhD.