



Posudek oponenta na magisterskou diplomovou práci Bc. Barbory Hejdové

Vliv klíštěcích slin na žírné buňky na úrovni signálních drah.

Sl. Hejdová se ve své práci zaměřila na aktuální téma účinků klíštěcích slin na hostitele a jeho imunitní systém a konkrétně na vliv na žírné buňky. Tyto ovlivňují prvotní imunitní odpověď hostitele na sání krve a jejich aktivace s následnou aktivací imunitního systému by mohla zamezit sání krve klíštětem.

Práce má obvyklý rozsah a obvyklé členění a svým rozsahem použitých metod a získaných výsledků bohatě naplňuje požadavky na magisterské práce. Výsledky této práce představují ucelený soubor nových poznatků, které ať už samostatně anebo po doplnění mohou být publikovatelné v odborném časopisu.

Práce obsahuje překvapivě málo překlepů, což je u současných studentů spíše výjimka a velké pozitivum a je to potřebné ocenit. Oceňuji také provedení optimalizace u použitých metod. K práci mám pak několik obecných připomínek. V případě zkratk vycházejících z cizojazyčných názvů je vhodné uvádět tyto názvy, zkratky jsou pak pochopitelnější. U obrázků, převzatých z cizojazyčné odborné literatury, je vhodné u česky psaných prací doplnit do obrázků české popisky. Vhodné je také vysvětlit zkratky, které se v těchto obrázcích vyskytují (např. Obr. 1). Obvykle se také číslované obrázky a tabulky uvádějí v textu s velkým prvním písmenem (Obrázek 1, popř. Obr 1 a ne obrázek 1). Ve kvalifikačních pracích bychom se pak měli vyvarovat hovorových a slangových výrazů jako například „se nakapal 1-2 ul“, „bylo stočeno“, „k dokončení reakce byl použit“ apod. Při uvádění centrifugační síly (RCF) se tato vyjadřuje obvykle jako násobky g, např. 160 x g. Elektrodový pufr pro SDS-PAG pak obsahuje 3,5 mM SDS a ne 3,5 M; koncentrace SDS se tak v tomto pufru obvykle uvádí v procentech. Zvyklostí je také zkracování rodového jména po prvním použití (*Ixodes ricinus* na *I. ricinus*). Za zamyšlení také stojí používání přebraných slov a jejich následné skloňování (array – z arraye apod.)

V diskuzi by se možná hodilo schéma s jednotlivými drahami a s ukázkou, kde a co je slinami aktivováno/inhibováno.

Pak mám ještě jednu připomínku a to k tzv. „Bradford protein assay“. Již nějakou dobu se v celém bývalém Československu objevuje překlad názvu této metody jako metoda



podle Bradfordové. To není tak úplně správné vzhledem k tomu, že tato metoda byla objevena panem Bradfordem :).

Na studentku mám několik otázek:

- 1) Mohla byste objasnit zkratky, které se objevují u Obrázku 1?
- 2) Žírné buňky tedy podstupují apoptózu v nepřítomnosti faktoru kmenových buněk (SCF, Str. 3) a v nepřítomnosti tohoto faktoru migrují z tkání pryč?
- 3) Str. 5: „... mediátory, které nabírají efektorové buňky ...“ Co je tím myšleno?
- 4) Str. 8: „... čeleď Ixodidae, která je důležitá i z lékařského hlediska a čeleď Argasidae ...“ Čeleď Argasidae tedy není významná z lékařského hlediska?
- 5) Str. 8: Mimo hostitele stráví klíště skutečně jenom 90 % svého života?
- 6) Kapitola 3.2.2, postup přípravy buněk pro průtokovou cytometrii – mohla byste uvést ředění protilátek, které jste používala? Kolikrát byly buňky po značení protilátkami promývány?
- 7) Můžete potvrdit podmínky elektroforézy a elektroblottingu? (40 mA/gel a 250 V po dobu 40-60 minut; 64 mA, 150 V po dobu 1 h 10 min)
- 8) Str. 39: U stimulovaných buněk je aktivita některých signálních molekul nižší než u nestimulovaných buněk – je takový výsledek správný a předpokládaný?
- 9) Mohla byste vysvětlit rozdíl ve výsledcích mezi aktivitou nestimulovaných a 5 min stimulovaných buněk u Obr. 14 a u Obr. 15?
- 10) Obr. 17 a 18: Lze nějak vysvětlit, že sliny po 30 minutách snižují a po 60 minutách naopak zvyšují aktivitu ERK1/2 MAP kinázy u MC/9 a obdobně v intervalech 10 a 30 minut u BMMC? Je možné ověřit případné spouštění apoptózy žírných buněk (jak naznačujete v diskuzi s ohledem na tyto výsledky i na výsledky u jiných ovlivňovaných molekul) vlivem klíštěcích slin *in vivo*?
- 11) Čím si vysvětlujete rozdíl ve Vašich výsledcích a výsledcích Kopecký et al. 1999 ohledně produkce IFN- γ ? Je to dáno jinými použitými buňkami, popř. rozdílem mezi slinami a extraktem ze slinných žláz?
- 12) Str. 49: Zmiňujete možnost zvýšení/snížení exprese MCP-1 vlivem slin v závislosti na fázi sání. Proč by bylo pro klíště výhodné v některé fázi sání zvyšovat a



v některé fázi snižovat expresi této signální molekuly, jak by to napomáhalo sání?

- 13) Str. 49: Zmiňujete možnost blokování cytokin-specifických protilátek anti-cytokinovými molekulami klíštěcích slin v průběhu ELISA stanovení. Přetrval by komplex cytokin-anti-cytokin v průběhu přípravy vzorku a mohla by skutečně vazba anti-cytokinů blokovat vazbu protilátky? Jak by se tom dalo zabránit?

Na závěr bych měl dvě obecnější teoretické otázky.

- I) Vzhledem k problémům s BMBC byste spíše doporučovala práci s buněčnými liniemi anebo podle Vás má smysl pokoušet se o práci s primárními žírnými buňkami?
- II) Bylo by možné aktivovat žírné buňky *in vivo* a využít této aktivace pro spuštění imunitní odpovědi hostitele proti klíšťatům?

Závěrem můžu konstatovat, že Bc. Barbora Hejdrová vypracovala velmi kvalitní práci, která splňuje všechny požadavky kladené na magisterské diplomové práce na Přírodovědecké fakultě Jihočeské univerzity a přispěla k poznatkům v oblasti vlivu klíštěcích slin na hostitele a jeho imunitní systém.

Práci proto doporučuji k obhajobě a navrhuji známku 1 (výborně).

V Českých Budějovicích, 12. 1. 2017

RNDr. Ján Štěrba, Ph.D.

Ústav chemie a biochemie



Oponentský posudek na magisterskou diplomovou práci Barbory Hejdové „Vliv klíštěcích slin na žírné buňky na úrovni signálních drah“

Barbora Hejdová předkládá diplomovou práci zabývající se interakcemi slin klíštěte *Ixodes ricinus* s myšními žírnými buňkami. V rámci výzkumu krev sajících členovců jsou žírné buňky neboli mastocyty poněkud opomíjené, přestože práce upozorňující na jejich souvislost s rezistencí ke klíšťatům jsou staré více než třicet let. Zároveň už žírné buňky nejsou vnímány pouze jako zdroj biogenních aminů, ale výzkum se více zaměřuje na regulační funkce mastocytů jako jsou produkce cytokinů a chemokinů, prezentace antigenu a související aktivace signálních drah. Z těchto důvodů je zvolené téma vysoce aktuální a práce si zaslouží maximální pozornost.

Hned na úvod musím konstatovat, že po formální a jazykové stránce je práce Barbory zřejmě nejkvalitnější ze všech, které jsem dosud oponovala. Překlepy a gramatické chyby se v práci prakticky nevyskytují a plynutí textu není rušeno neobratným překladem z angličtiny. Okrajově lze vytknout nedůsledné vysvětlování zkratk v textu při jejich prvním použití (např. LT_{B4} na str. 6) nebo občasná chybějící čárka před souslovím „a to“. Naopak musím vyzdvihnout oddíl 2.3 o vybraných signálních molekulách; celá kapitola působí dojmem, že autorka to množství citované literatury nejenom skutečně četla, ale v komplikované problematice se velmi dobře zorientovala a dala informace do souvislostí.

Cíle práce jsou jasné a metodika je přehledná a dostatečně podrobná, zde upozorňuji pouze na chybnou koncentraci penicilinu ve složení médií. Koncentrace buněk v experimentu se vždy uvádí na 1 ml, nikoliv na 200 nebo 500 μ l. Výsledky jsou pěkně graficky zpracované a uspokojivě diskutované na pěti stranách. Všechna tvrzení jsou poctivě ocitována, přičemž seznam použité literatury čítá téměř 200 položek.

Na autorku mám následující dotazy a faktické připomínky:

- 1) Str. 3, Obr. 1: V popisku obrázku se uvádí, že heterogenita MC v kostní dřeni je způsobena mj. i pohlavím. Jaké jsou tedy rozdíly v MC mezi muži a ženami?
- 2) Str. 7: V kap. 2.1.5 rozdělujete mediátory na uložené v granulích a syntetizované *de novo*. Do které skupiny podle Vás patří TNF?
- 3) Na str. 18 uvádíte, že Akt3 je exprimována převážně v mozku či varlatech. Existuje nějaká souvislost mezi expresí Akt3 a faktem, že zmíněné orgány jsou označovány jako imunologicky privilegované?
- 4) Str. 26: Kolik bylo při měření čistoty derivovaných MC dvojité pozitivních buněk, které nesly znak CD117 i Fc ϵ R?
- 5) Str. 29: K čemu slouží Na₃VO₄ v lyzačním roztoku?



- 6) Str. 32: Nerozumím formulaci „Nárůst aktivity signálních molekul oproti nestimulované kontrole je pokládán za 100 % v každém jednotlivém intervalu.“ V grafech má potom hodnotu relativní fosforylace 1,0 skupina Iono (Obr. 18) nebo skupina Iono+sliny (Obr. 19) nebo žádná z testovaných skupin (Obr. 20). Prosím o bližší vysvětlení těchto výpočtů.
- 7) Na str. 48 uvádíte, že inhibice produkce IFN- γ v myších splenocytech (Kopecký et al. 1999) byla pravděpodobně zprostředkována upregulací IL-10. Existují nějaké důkazy o vzájemné přímé regulaci IL-10 a IFN- γ ?

Závěr: Barbora Hejdová jasně prokázala schopnost zorientovat se v odborné literatuře a napsat odborný text, stejně jako kriticky zhodnotit získaná data. Její magisterskou diplomovou práci plně **doporučuji k obhajobě**, neboť splňuje všechny požadavky kladené na závěrečné práce na Přírodovědecké fakultě Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích.

V Českých Budějovicích 5. ledna 2017

RNDr. Helena Langhansová, Ph.D.