

## Oponentský posudek na magisterskou diplomovou práci Bc. Adély Chlastákové „Zavedení a optimalizace *in vivo* modelů zánětu a jejich využití pro funkční analýzu inhibitorů proteáz z klišťecích slin“

Adéla Chlastáková se ve své diplomové práci zaměřila na vytvoření dvou *in vivo* modelů zánětu na myši, peritonitidy a edému tlapek. Oba typy zánětu vyvolala nespecificky podáním thioglykolátového media respektive polysacharidu připraveného z mořských řas. Součástí obou modelů bylo zařazení běžně užívaných inhibitorů zánětu indometacinu a dexametazonu. Modely musely být vybalancovány tak aby umožňovaly s dostatečnou citlivostí testovat protizánětlivý efekt molekul z klišťecích slin nebo jiných protizánětlivých látek. U peritonitidy Adéla pomocí průtokové cytometrie sledovala v čase zastoupení i absolutní počty jednotlivých subpopulací zánětlivých buněk reprezentujících jak přirozenou, tak adaptivní specifickou imunitu. V případě otoku tlapy byl hodnocen nárůst velikosti tlapek v čase. Nakonec byl na obou optimalizovaných modelech hodnocen protizánětlivý účinek dvou cystatinů z našeho klišťete *Ixodes ricinus*.

V úvodu na 17 stranách Adéla poskytla základní informaci o klišťatech a účincích klišťecích slin na buňky přirozené imunity. Dále charakterizovala cysteinové proteázy a vlastnosti cysteinových katepsinů. Podrobně se věnovala cystatinům, zejména sialostatinům z amerického klišťete *I. scapularis*. V dalších kapitolách se autorka zaměřila na peritonitidu vyvolanou aplikací thioglykolátového media, zastoupení a funkci myeloidních buněk v tomto modelu. Nakonec Adéla popsala otok tlapek vyvolaný karagenanem a imunitní mechanismy v něm zahrnuté. Následovala formulace cílů práce ve dvou bodech.

Metodická část spočívala hlavně v aplikaci induktorů zánětu a protizánětlivých léků indometacinu a dexametazonu. Základní metodou byla pro Adélu vícebarevná průtoková cytometrie pomocí níž měřila celkem 10 typů buněk. Otok tlapek měřila mikrometrem.

Z hlediska využití modelu peritonitidy jsou významné již první výsledky ukazující změny v počtu peritoneálních buněk v čase. Tyto počty dosáhly za 48 hodin po aplikaci TGM až 32 milionů ve srovnání s necelými dvěma miliony u nestimulovaných myší. Další grafy, kterých je celkem 27, ukazují procentuální zastoupení jednotlivých buněčných populací a absolutní počty buněk. To se týká neutrofilů, monocytů, makrofágů, eozinofilů, B a T lymfocytů. Nakonec byly optimalizovány dávky TGM v kombinaci s INDO a DEX tak, aby se účinek obou protizánětlivých látek dostatečně projevil. Podle očekávání bylo nevyšší zastoupení neutrofilů v buňkách peritoneálního výplachu za 4 hodiny po podání TGM, zastoupení monocytů kulminovalo za 8 hodin, makrofágů za 72 hodin po aplikaci TGM. Eosinofily byly nejvíce zastoupeny za 24, respektive 48 hodin po TGM, zastoupení B a T lymfocytů mělo po podání účinnějšího TGM 2 sestupnou tendenci. Aplikace obou klišťecích cystatinů významně snížila počty myeloidních buněk za 4 hodiny po injekci TGM. Cystatin G9 významně inhiboval migraci neutrofilů a monocytů.

Aplikace karagenanu vedla k dvoufázovému průběhu edému tlapek. Z protizánětlivých léků byl v potlačení otoku tlapy účinnější dexametazon, který byl dále užíván jako pozitivní



kontrola. Oba klíštěcí cystatiny sice vykazovaly protizánětlivý účinek, ten však nebyl ve většině pokusů statisticky významný.

Obsáhlá diskuse na 11 stranách podrobně diskutuje jednotlivé výsledky a je strukturována podobně jako kapitola Výsledky. Adéla důsledně porovnává průběh peritonitidy s výsledky jiných autorů a změny v jednotlivých buněčných populacích vysvětluje produkcí chemokinů a dalších chemoatraktantů. Snaží se i vysvětlit odlišnou prozánětlivou aktivitu dvou použitých TGM. V diskusi vysvětluje mechanismus účinku indometacinu a dexametazonu a opět porovnává svoje výsledky se světovou literaturou. Protizánětlivý účinek cystatinů na migraci neutrofilů vysvětluje interferencí cystatinů s adhezí neutrofilů k proteinům ECM. Podrobně diskutuje vliv INDO a DEX na otok tlapek a vysvětluje možné mechanismy účinku těchto inhibitorů. Protizánětlivé účinky klíštěcích cystatinů na modelu otoku tlapy jsou podle Adély způsobeny omezenou migrací neutrofilů a monocytů které jsou producenty ROS, NO a prostaglandinů přispívajících k vývoji edému.

V Závěru Adéla shrnuje dosažené výsledky. Následuje seznam použitých zkratk a seznam použité literatury čítající úctyhodných 178 citací. Celkem má práce 81 stran.

Diplomová práce Adély Chlastákové je psána pěkným srozumitelným vědeckým jazykem bez překlepů, je přehledná a velmi dobře dokumentovaná. Zejména kvalita a rozsah diskuse přesahuje parametry obvyklé pro diplomové práce na naší fakultě. Adéla ukázala schopnost naplánovat, provést a vyhodnotit experimenty a porovnat je s dostupnou literaturou. Její výsledky jsou výborným východiskem pro hodnocení protizánětlivých a imunomodulačních látek nejen klíštěcího původu.

Otázky a komentáře:

Str. 11 a 12: Ve výčtu účinků sialostatinů na buňky imunitního systému chybí dvě citace Lieskovská et al. 2015 o vlivu na interakci dendritických buněk s boreliemi a supresi interferonové odpovědi v DC.

Str. 23: Proč se myši před usmrcením zlomením vazů uspávaly, kolik bylo užito halotanu a jak byl podán?

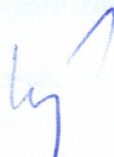
Str. 30 a další: V případě dynamiky výskytu buněk přirozené imunity po podání TGM 2 chybí interval 24 hodin, což je škoda, protože na příklad u eozinofilů byl největší výskyt po TGM 1 zaznamenán právě za 24 hodin.

Str. 55: Má autorka nějakou představu o mechanismu účinku cystatinů při inhibici migrace buněk v případě peritonitidy? Uplatňují se jako inhibitory cysteinových proteáz?

Jakým mechanismem vyvolá TGM zánět? Uplatňuje se zde také signalizace přes PRR?

**Závěr:** práci doporučuji k obhajobě a hodnotím ji jako výbornou.

V Českých Budějovicích 28. 12. 2016



Prof. RNDr. Jan Kopecký, CSc.



## **Oponentský posudek diplomové práce Bc. Adély Chlastákové**

Název práce: Zavedení a optimalizace *in vivo* modelů zánětu a jejich využití pro funkční analýzu inhibitorů proteáz z klíštěcích slin.

### Úvod a metodika:

Předkládaná práce je po formální stránce velmi dobře zpracována. V úvodu nás autorka v krátkosti seznámí s klíšťaty, popíše jejich životní cyklus, ale převážně se věnuje imunologické problematice, tedy účinkem klíštěcích slin na jednotlivé složky adaptivní imunity, charakterizuje použité dva akutní zánětlivé modely a shrne poznatky o cysteinových proteázách a jejich inhibitorech-cystatinech. V metodické části autorka důkladně popíše použití průtokové cytometrie při charakterizaci peritoneálních buněčných populací.

### Výsledky:

V první části autorka zavádí a optimalizuje *in vivo* model akutního zánětu vyvolaným intraperitoneální aplikací thioglykolátu. Jelikož výsledky jsou založeny na průtokové cytometrii, velmi správně dokumentuje tzv. gatovací strategii. Dobré zvládnutí peritoneální laváže je patrné z výsledků uvedených v příloze 1. obr. 22 ukazující zastoupení jednotlivých buněčných populací. Z testovaných dvou thioglykolátů, měl druhý výraznější prozánětlivý účinek. Použití kontrolních protizánětlivých léků vedlo ke snížení zánětu resp. infiltraci buněčných populací (obr. 15). Testované cystatiny G1 a G9 snížily počet myeloidních buněk v peritoneu. V případě cystatinu G9 navíc došlo také ke snížení počtu neutrofilů a monocytů.

V druhé části výsledků autorka optimalizovala druhý model akutního zánětu- otok tlapek po aplikaci karagenanu. Nižméně inhibiční účinek cystatinů G1 a G9 v tomto modelu nebyl prokázán či experimentálně zopakován.

### Komentáře:

Literární úvod a metodický popis včetně citací je v souladu s řešenou problematikou. Práce je členěna standardně do jednotlivých kapitol a je srozumitelná. Samotné výsledky jsou náležitě komentovány a diskutovány. Práci doporučuji k obhajobě. Výsledné hodnocení-výborně.

Osobně bych asi volil jinou strukturu prezentací výsledků, za účelem zjednodušení informace a rozhodně bych se nebál některé grafy zredukovat resp. přesunout do přílohy. Zejména první část, peritonitida a srovnání účinku dvou thioglykolátů, je zjevné že TGM1 nemá správný prozánětlivý efekt, není charakteristická buněčná infiltrace, informace srozumitelná již s obr. 6. Proto bych se zaměřil na prezentaci výsledků s TGM2. Na druhou stranu bych upřednostnil grafy s přílohy obr. 22 a 24 charakterizující buněčné populace v peritoneum před a po podání TGM2.

Otázky:

1. Rád bych viděl prototypický obrázek cytometrických dat ukazující jednotlivé populace v peritoneu po aplikaci TGM 2. (4h a 72h). Viz. graf 24 v příloze.
2. Existují nějaké alternativní metody testování, které byste doporučila pro řešení funkční analýzy inhibitorů proteáz z klišťecích slin? Pokud ano, proč jste je nevyzkoušela?
3. V případě edému u tlapek, uvažujete o provedení měření myeloperoxidázové aktivity?

V Drážďanech 10.1.2017

  
Mgr. Aleš Neuwirth Ph.D.