



**BIOLOGICKÉ CENTRUM AV ČR, v. v. i.**

**Parazitologický ústav**

adresa: Branišovská 1160/31, 370 05 České Budějovice

telefon: +420 387 775 403

fax: +420 385 310 388

IČ: 60077344 | DIČ: CZ60077344

číslo účtu: 6063942/0800, Česká spořitelna, a.s.

www.paru.cas.cz | e-mail: paruu@paru.cas.cz

Oponentský posudek diplomové práce Bc. Zuzany Beránkové:

**Vliv klíštěcích slin na replikaci viru klíštěvé encefalitidy v myších makrofázích.  
Úloha interferonu- $\beta$  a oxidu dusnatého.**

Magisterská diplomová práce Bc. Zuzany Beránkové se zabývá tématem imunitní odpovědi myších makrofágů vůči infekci virem klíštěvé encefalitidy (VKE) a jejím případným ovlivněním klíštěcími slinami. Konkrétně se práce soustředí zejména na produkci oxidu dusnatého, aktivaci a regulaci produkce interferonu-beta (IFN- $\beta$ ) a jejich vliv na infekci tří různých linií myších makrofágů a makrofágů izolovaných peritonea a kostní dřeně myši.

Celá práce je napsána kultivovaným, dobře srozumitelným jazykem a členěna do logicky navazujících celků. Po formální stránce je práce prakticky bezchybná. Po jazykové stránce snad jediná drobnost - používání slangového výrazu „štípání“ pro štěpení proteinů. Jednotlivé části práce jsou vyváženě zastoupené a autorka používá relevantní zdroje pro citace a správně je uvádí v seznamu použité literatury.

V úvodní části práce autorka na celkem 18 stranách shrnuje základní poznatky o VKE s detailnějším popisem cyklu replikace viru v hostitelské buňce, dále popisuje úlohu makrofágů v protivirové imunitní odpovědi, mechanismy jejich aktivace a zapojení do imunitní signalizace. Zvláštní kapitoly jsou věnovány roli oxidu dusnatého, interferonů typu I a ovlivnění hostitelského prostředí klíštěcími slinami, a to zejména ve vztahu k přenosu patogenů. Text je vhodně doplněn převzatými schématy, která dobře dokreslují složitější mechanismy imunitní signalizace. U obrázků 3 a 4 mi ovšem jako „neimunologovi“ chybělo vysvětlení zkratk v popiskách.

Práce zahrnovala široké spektrum metod od rutinní kultivace několika různých kultur makrofágů a jejich infekce dvěma kmeny VKE, přes stanovení titru viru pomocí plakové titrace a proinfikovanosti buněk pomocí nepřímé imunofluorescence (IFA), po měření produkce oxidu dusnatého a IFN- $\beta$ . Studentka také stanovovala viabilitu buněk a jejich apoptotickou aktivitu pomocí několika metod včetně měření na průtokovém cytometru. Jednotlivé metody jsou dostatečně a přehledně popsány. Chybí mi jen alespoň stručná zmínka o historii pasáží použitých kmenů VKE a bližší popis stanovení proinfikovanosti buněk pomocí IFA – je zde popsáno barvení, ale ne jeho vyhodnocení.



Rovněž kapitola výsledky je přehledně a uceleně zpracována. Jen postrádám prezentaci negativních kontrol u fluorescenčních barvení a u obrázku 6A (str. 30) dokumentujícího replikaci VKE mi zcela chybí křivka pro makrofágovou linii P388/D1.

V rámci diskuze autorka správně konfrontuje získané výsledky s dříve publikovanými pracemi, i když často spíše v obecné rovině a v některých pasážích sklouzává k opakování výsledků. Diskuze je, dle mého názoru, jedinou slabší částí práce. Pro vylepšení této části bych doporučil pokusit se více propojit výsledky jednotlivých experimentů mezi sebou a celou diskuzi stavět z většího nadhledu. Tedy nezabývat se dílčími výsledky uvedenými v příslušné kapitole, ale spíše jejich významem v kontextu ostatních faktů ať již získaných v rámci této práce nebo zjištěných v literatuře. V závěru autorka přehledně shrnuje v několika bodech nejvýznamnější výsledky práce.

Studentku prosím o reakce na následující otázky:

Metody:

Zaujaly mne pokusy s přidáváním klíštěcích slin, v této prosím o stručný komentář k následujícím otázkám:

- 1) Liší se složení slin nasátých a nenasátých, případně infikovaných a neinfikovaných klíšťat? Mohly případné odlišnosti ovlivnit výsledky testování vlivu slin?
- 2) Je možné nějakým způsobem sliny od nenasátých klíšťat?
- 3) V jakém časovém úseku zůstávají sliny v kultuře biologicky aktivní?

Výsledky:

1) Na str. 33 uvádíte, že u linie IC-21 bylo proinfikováno 22,7 % buněk, zatímco v rámci testování vlivu klíštěcích slin je u téže linie u kontroly infikované stejným kmenem o stejné multiplicitě infekce dosaženo proinfikovanosti 43,1 %. Obdobně na str. 13 (obr. 13.) dosahuje množství produkovaného IFN- $\beta$  přes 250 pg/ml, zatímco v pokusu ověřujícím vliv slin dosahuje kontrola bez slin pouze něco pod 100 pg/ml.

Přijde mi, že se design experimentů se slinami se neliší od původních experimentů. Čím je tedy možné vysvětlit rozdíly v absolutních hodnotách?

2) Jaký typ kontroly byste zvolila pro ověření specifity vazby sekundární protilátky v případě nepřímé imunofluorescence? Byla nějaká negativní kontrola provedena?



Diskuze:

- 1) V diskuzi porovnáváte své výsledky z aplikace klíčecích slin i s výsledky prací kde byl použit extrakt ze slinných žláz (SGE). Jaké výhody/nevýhody spatřujete v použití slin oproti SGE? Je možné odhadnout nějaké rozdíly v jejich působení?
- 2) Na str. 48 uvádíte, že makrofágová linie IC-21 může mít defekt v dráze produkce IFN- $\beta$ . Jak byste tuto hypotézu ověřila?
- 3) Na str. 49 uvádíte, že „zvýšená produkce IFN- $\beta$  neovlivňuje replikaci VKE“, zatímco na str. 50 dáváte do souvislosti zvýšení titru viru s narušením interferonové dráhy. Chápu, že efekt interferonu není zcela jednoznačný, ale jelikož se jedná o jednu ze zásadních otázek práce, mohla byste se pokusit roli interferonu v infekci makrofágů VKE souhrnně popsat na základě kombinace výsledků z Vašich jednotlivých experimentů, případně ještě zohledněním dalších známých faktů z literatury?

Studentka se s metodicky náročným tématem (ještě komplikovaným použitím několika typů buněčných kultur) a interpretací ne zcela jednoznačných výsledků vypořádala více než dobře a s přehledem splnila cíle práce definované v jejím úvodu. Diplomovou práci Zuzany Beránkové práci tedy rozhodně doporučuji k obhajobě. Prozatím navrhuji práci hodnotit stupněm výborně, definitivní hodnocení nechávám po prezentaci práce u obhajoby a reakcích studentky na otázky.

V Českých Budějovicích, 16.5.2017

Mgr. Václav Hönig, PhD.

**Posudek oponenta na diplomovou práci Bc. Zuzany Beránkové: Vliv klíštěcích slin na replikaci viru klíšťové encefalitidy v myších makrofázích. Úloha interferonu-beta a oxidu dusnatého.**

Studentka Bc. Zuzana Beránková předložila k obhajobě na Katedře medicínské biologie Přírodovědecké fakulty Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích diplomovou práci, kterou vypracovala pod vedením prof. Jana Kopeckého a Dr. Jaroslavy Lieskovské. Cílem práce bylo charakterizovat množení viru klíšťové encefalitidy (KE) v myších makrofázích, ovlivnění replikace viru slinami klíšťat a dále stanovit vliv klíštěcích slin na produkci oxidu dusnatého a IFN- $\beta$  a aktivaci apoptózy u makrofágů po infekci virem KE. Téma práce je vysoce aktuální a vychází z dlouhodobého výzkumného zaměření laboratoře školitele.

Rozsah práce je 63 stran textu a 2 strany příloh. Práce je tradičně členěná na Literární přehled, Cíle práce, Materiál a metody, Výsledky, Diskusi a Závěr. Následuje Seznam zkratk a Seznam použité literatury.

Práce je psaná kvalitní češtinou s minimem pravopisných chyb a překlepů. Do textu se vloudilo několik neobratných či slangových výrazů a slovních spojení (např. fatální příznaky, neuroinvasivnost, vyizolován, promyto centrifugací apod.), jejich množství je ale plně na tolerovatelné úrovni.

Po odborné stránce je práce vysoce kvalitní. Autorce se podařilo získat obdivuhodné množství originálních experimentálních dat, která mohou představovat základ pro budoucí odbornou publikaci. Zejména bych vyzdvihl zjištění týkající se (i) odlišné míry množení viru KE v jednotlivých makrofágových liniích, (ii) vlivu klíštěcích slin na aktivaci procesu apoptózy u infikovaných makrofágů, (iii) vlivu klíštěcích slin na produkci IFN- $\beta$  v infikovaných makrofázích a konečně (iv) zvýšení množení viru následkem ovlivnění interferonové dráhy specifickými inhibitory.

K textu mám následující připomínky a dotazy, které však nikterak nesnižují celkově vysokou kvalitu předložené diplomové práce. Prosím o zodpovězení zejména otázek tučně zvýrazněných.

- 1. Na str. 1 autorka uvádí, že zástupci evropského subtypu viru KE se vyskytují na většině území Evropy. Je autorce známo, v jakých jiných oblastech světa mimo Evropu byly identifikovány kmeny viru KE spadající do evropského subtypu?**
- 2. Na str. 3 autorka uvádí, že přenos viru KE sousáním představuje nejdůležitější cestu přenosu viru v přírodě. Souhlasím s autorkou, že se jedná o důležitý způsob přenosu. Dalo by se však polemizovat o tom, zda se skutečně jedná o způsob nejdůležitější. Mohla by autorka krátce diskutovat, v čem tkví hlavní nedostatky, a naopak výhody této cesty přenosu oproti jiným způsobům?**
- Je škoda, že v rámci celého literárního přehledu jsou otázky vlivu klíštěcích slin na přenos patogenů věnovány pouhé dva odstavce. Na druhou stranu autorka rekapituluje obsáhlé učebnicové pasáže o makrofázích, oxidu dusnatém a interferonu, které by bylo možné výrazně zredukovat.
- Str. 20. Jakého stáří byly myši v okamžiku použití v experimentu? Doplňte prosím informaci o schváleném projektu pokusu na zvířatech v souladu s legislativou.
- Str. 20. Je známo, jakou pasážovací historií prošly kmeny viru KE před použitím v popsáných experimentech?
- 6. Str. 21. Vzhledem k tomu, že byl odběr slin prováděn u klíšťat pocházejících z volné přírody, zajímalo by mne, zda byla klíšťata po odběru slin vyšetřena na přítomnost patogenů, zejména viru KE a spirochét *Borrelia burgdorferi* s.l.? Případná infekce by totiž mohla vést ke značnému zkreslení výsledků.**

**VRI****VETERINARY  
RESEARCH  
INSTITUTE**

Výzkumný ústav  
veterinárního lékařství, v. v. i.  
**Veterinary Research Institute**  
Hudcova 296/70  
621 00 Brno  
Czech Republic

vri@vri.cz

Director's Office:  
+420 5 3333 2501

Operator:  
+420 5 3333 1111

www.vri.cz

7. Kolik nezávislých šarží slin bylo použito při opakování experimentů? Jaká je míra variability získaných dat v případě použití slin z různých nezávislých odběrů?
8. Z jakého důvodu byla použita pro infekci makrofágů multiplicita infekce rovna 4? Byly provedeny nějaké předběžné experimenty s různými dávkami inokula?
9. Z jakého důvodu byly některé experimenty prováděny s kmenem Hypr i Neudoerfl, zatímco jiné pouze s kmenem Hypr? Z jakého důvodu byla v případě testování vlivu inhibitorů interferonové dráhy na replikaci viru KE použito nižší m.o.i. než v jiných testech?
10. Str. 30, obr. 6: Byly rozdíly analyzovány statisticky?
11. Str. 31, obr. 7. Má autorka nějaké vysvětlení pro rozdílné výsledky prezentované na obr. 6 a 7? Na obr. 6 kmen titr kmenu Hypr v kultuře PMJ2-R dosahuje v intervalu 72 hodin téměř 8 log<sub>10</sub> pfu/ml, zatímco na obr. 7 je to ve stejné linii a čase o téměř dva řády méně.
12. Str. 32: Změna titru v řádu 4% odpovídá spíše běžné pipetovací chybě či standardní chybě plakové titrace. Nepřikládá bych jí tedy větší význam. Autorka uvádí, že pokusy byly minimálně 3x opakovány – tedy přesně kolikrát?
13. Str. 33 a přílohy: přiložené obrázky z imunofluorescenčního značení mají poměrně malou vypovídací hodnotu – buňky byly focené při velkém zvětšení, v zorném poli je tedy jen nízký počet buněk a rozdíly mezi ošetřenou a neošetřenou skupinou nejsou moc patrné. Lepší by bylo pořídít obrázky při malém zvětšení. Kolik buněk v kolika zorných polích bylo počítáno při stanovení procenta infikovaných buněk?
14. Str. 35-36, obr. 12 a 13: byly skupiny porovnány statisticky?
15. Str. 38 a jinde: autorka mluví o opakování pokusů – představují prezentované grafy výsledky všech pokusů dohromady?
16. Str. 41: Pokusila se autorka u měření procenta apoptotických buněk o dvojí značení též na virový antigen, aby bylo možné říci, že hynou tímto způsobem primárně buňky, které jsou infikované?
17. Diskuse: u diskutovaných nepublikovaných dat by bylo vhodné specifikovat, zda se jedná o data autorky práce. V případě, že se jedná o data někoho jiného, měl by být dotyčný jmenován.
18. Které z výsledků sama autorka pokládá za zásadní a jaké další experimenty navrhuje pro potvrzení popsáných závěrů?

**Závěr:** Autorka jednoznačně prokázala schopnost samostatné výzkumné laboratorní práce, analýzy a vyhodnocení výsledků, práce s odbornou literaturou a tvorby odborného textu. Cíle práce byly jednoznačně splněny. V diplomové práci prezentuje řadu originálních experimentálních dat, která by bylo vhodné po doplnění některých dalších experimentů zpracovat do podoby publikace ve vědeckém časopisu. Předložená diplomová práce jednoznačně splňuje nároky kladené Přírodovědeckou fakultou Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích, proto ji **doporučuji k obhajobě** a navrhuji klasifikovat stupněm **výborně**.

V Brně dne 16. května 2017

  
doc. RNDr. Daniel Růžek, Ph.D.