

Posudek na diplomovou práci Bc. Lenky Doudové „Ověření vlivu primárních imunitních buněk a jejich detekovatelných markerů během časně fáze infekce virem klíšťové encefalitidy“

Lenka Doudová se ve své diplomové práci zabývá genovými markery z rodiny IFIT a OAS v souvislosti s časnou fází infekce buňky virem KE *in vitro* i *in vivo*. Dalším významným cílem diplomové práce bylo ověření transportní úlohy Langerhansových buněk při přenosu viru KE z místa inokulace do spádových lymfatických uzlin.

První částí diplomové práce je literární úvod, který zahrnuje informace o viru KE, dále jsou popsány vlastnosti a úloha Langerhansových buněk a makrofágů v patogenezi virové infekce a nakonec se autorka věnuje antivirovým proteinům z rodiny IFIT a OAS, které jsou kódovány geny stimulovanými interferonem.

Následuje rozsáhlá metodická část na 10 stranách, kde jsou podrobně popsány metody izolace makrofágů a Langerhansových buněk z kostní dřeně, jejich sortování a infekce dvěma kmeny viru KE s odlišnou invazivitou. Následuje infekce myši virem, izolace orgánů a kvantifikace virové RNA a RNA vybraných markerů z rodin IFIT a OAS metodou jednokrokové qRT-PCR. Kromě RT-PCR bylo množství viru stanoveno i plakovou titrací a množství antivirových proteinů metodou ELISA.

Je vidět, že diplomová práce je metodicky náročná, zahrnuje metody z oblasti molekulární biologie, imunologie i „klasické“ virologie.

Získané výsledky jsou podrobně popsány, dokumentovány jedenácti pěknými grafy včetně statistického zpracování.

Diskuse je neobvykle obsáhlá (6 stran), snaží se vysvětlit získané výsledky a konfrontovat je se světovou literaturou.

Závěr shrnuje v devíti bodech nejdůležitější dosažené výsledky.

V úvodu nechybí seznam použitých zkratk.

Přehled citované literatury zahrnuje cca 130 citací.

K diplomové práci mám následující připomínky a dotazy:

Mám drobnou připomínku k názvu práce. Když slyším „vliv“, ptám se na co. Takže bych spíše než vliv volil slovo „význam“.

Část věnovaná antivirovým proteinům z rodiny IFIT a OAS se mi spíš jeví jako metodicky významná (což nijak nesnižuje její kvalitu), protože stanovení těchto proteinů třeba v séru pacientů se zatím z diagnostického hlediska nejeví výhodnější než stanovení virové RNA, která je detekována v leukocytech už za jeden den po infekci.

Na str. 20 se mluví o kompletním RPMI mediu, ale není vysvětleno, co toto kompletní medium obsahuje.

Na str. 32 je popsán poměrně velký rozdíl ve viabilitě makrofágů infikovaných kmenem Sofjin ve srovnání s kmenem Hypr (za dva dny 150% kontroly). Vzhledem k použitému testu na stanovení viability (alamarBlue), nemůže být tento výsledek způsoben pomnožením makrofágů, nebo jejich aktivací virem, či indukovanými cytokiny?

Z hlediska vědeckého poznání se mi jako nejvýznamnější výsledek jeví důkaz transportní úlohy Langerhansových buněk v přenosu virové infekce do lymfatických uzlin. Tady Lenka Doudová rozšířila pozorování Milana Labudy staré skoro 30 let a tento výsledek stojí podle mne za publikaci. Možná by bylo dobré stanovit titr viru v Langerhansových buňkách těsně před inokulací do myší, aby bylo možno ho srovnat s 1000 PFU použitými k infekci v pozitivní kontrole.

V souvislosti s replikací viru KE v buňkách přirozené imunity by mě zajímalo, jaká je známá délka replikačního cyklu tohoto viru a jestli se liší podle typu buňky.

Langerhansovy buňky patří mezi dendritické buňky, které jsou velmi významné v prezentaci antigenu. Co znamená termín zkřížená prezentace (cross-presentation)?

Závěr: Lenka Doudová předložila velmi kvalitní diplomovou práci, jejíž nejméně jedna část je publikovatelná. Podle mého názoru bohatě splňuje nároky na diplomové práce na PŘF JU. Práci doporučuji k obhajobě a navrhuji známku „výborně“.

V Českých Budějovicích 15. 5. 2023

Prof. RNDr. Jan Kopecký, CSc.