

Autor(ka):	Bc. Tereza Štajnerová
Obor:	Klinická biologie
Datum odevzdání posudku:	15. 5. 2018
Oponent diplomové práce:	Doc. PaedDr. Radka Závodská, Ph.D.

POSUDEK DIPLOMOVÉ PRÁCE

Vliv klíštěcích slin na vývoj zánětu indukovaného boreliemi v kůži myši

Předložená práce obsahuje 41 stran textu a cituje 145 literárních zdrojů.

Diplomová práce Bc. Terezy Štajnerové je zaměřena na imunocytoologickou detekci neutrofilních granulocytů a makrofágů v kůži myši, u níž byl indukován zánět injekcí média obsahujícího spirochéty *Borrelia afzelii*, a studium vlivu klíštěcích slin na vývoj zánětu z hlediska množství neutrofilů a makrofágů v zánětlivé tkáni. Vedle výzkumného cíle, bylo dalším cílem práce zvládnout histologické a imunohistochemické metody. Je škoda, že v práci chybí úvod, který by na začátku vysvětlil, proč si autorka takové cíle určila, jaký je význam její studie a zjišťování množství neutrofilů a makrofágů. Proč nebyla v zánětlivé tkáni zjišťována přítomnost a porovnáváno množství dalších imunitních buněk jako jsou např. lymfocyty?

Literární rešerše je obsáhlá, po obsahové stránce zpracována precizně a poskytuje přehledné informace týkající se vzniku a průběhu zánětlivé reakce s přihlédnutím k roli neutrofilních granulocytů a makrofágů. V druhé části literárního přehledu se autorka zabývá charakteristikou slin klíštěte a jejich působením na buňky imunitního systému hostitelského organismu.

Metody výzkumné práce jsou popsány stručně, ale jasně a srozumitelně. Autorka však mohla přesněji popsat způsob zjišťování počtu imunopozitivních buněk v programu Image J (v textu uvedeno, že „počet byl zjištěn manuálním počítáním buněk v programu Image J“) a popsat jednotlivé skupiny vzorků, které byly podrobeny imunocytochemickému šetření.

Zatímco kapitoly Literární přehled a Diskuse jsou obsáhlé, v kapitole Výsledky jsou autorčina zjištění popsána velmi stručně. Výsledky jsou koncipovány spíše jako obrazový atlas s krátkými texty (jednotlivé podkapitoly) s odkazy na fotografie. Bylo by vhodnější, kdyby Bc. Tereza Štajnerová výsledky obrazových analýz uvedla v souvislém textu, nejen v rámci legendy pod obrázkem. Fotografie prezentované v práci jsou však zdařilé a ukazují výsledky, které zvolené imunohistologické metody přinesly. Autorce se podařilo dokumentovat přítomnost makrofágů a neutrofilů v místě zánětu v kůži myši a pozorovat rozdíly v lokalizaci a počtu těchto imunitních buněk ve vzorcích tkáně ovlivněné boreliemi a tkáně ovlivněné současně boreliemi a klíštěcími slinami. Pokles počtu makrofágů i počtu neutrofilních granulocytů, ke kterému došlo v případech injekce *Borrelia afzelii* spolu se slinami klíštěte byl dokumentován též statistickým vyhodnocením.

Autorka práce zvládla náročné histologické a imunocytochemické metody na velmi dobré úrovni, rovněž samostatnou práci a analýzu na konfokálním mikroskopu. Autorka však v textu předložené práce nevyužila veškerý potenciál odvedené laboratorní činnosti a získaných výsledků. Bc.

Tereza Štajnerová musela testovat několik primárních protilátek, což zahrnovalo zpracování velkého množství vzorků a jejich analyzování. S přihlédnutím k této skutečnosti, která není v práci uvedena, oceňuji autorčinu dovednost, kterou prokázala při přípravě vzorků a časovou náročnost při testování vhodných protilátek (tato skutečnost je rovněž zahrnuta do závěrečného hodnocení práce).

Formální stránka

Formální členění práce je logicky uspořádané, chybí však úvod. Převzaté informace jsou v textu řádně vyznačeny a správně citovány. Grafické zpracování má dobrou úroveň. Pravopisně a stylisticky je text na potřebné úrovni, překlepy a gramatické chyby se objevují v malé míře (např. „fascie“ místo „fascie“ na str. 8, „přistátí klíštěte“ místo „přisátí klíštěte“ na str. 13, „autoři uvádí“ místo „uvádějí“ na str. 14,16.)

Připomínky a otázky

Uveďte, jak jste postupovala při počítání buněk s pozitivním signálem v programu Image J.

Místo „bylo spočítáno 27 čtverců“, uveďte „bylo vyhodnoceno 27 čtverců“.

Z které části těla pokusné myši byl odebrán vzorek kůže?

Vysvětlíte, proč jste použila sekundární protilátku Goat anti –Rat IgG (H+L) Cross –Adsorbed, Alexa Fluor 647?

Proč nebyly testovány vzorky z více pokusných jedinců?

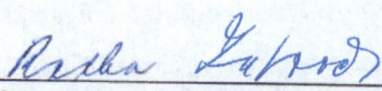
Na základě čeho jste identifikovala imunitní buňky v kůži myši označené na obr. 5, 6 a 7?

Závěr

Bc. Tereza Štajnerová splnila cíle uvedené v předložené práci (nemohla jsem ověřit a porovnat s cíli zadané školitelem, zadání diplomové práce nebylo uvedeno v IS STAG). Autorka práce ukázala na základě adekvátně zvolených výzkumných metod, že v místě zánětu vyvolaném boreliemi, došlo v přítomnosti klíštěcích slin k významnému poklesu počtu infiltrovaných neutrofilů a makrofágů. K potvrzení protizánětlivých účinků slin klíštěte *Ixodes ricinus*, které by se projevíly redukcí počtu imunitních buněk v místě zánětu vyvolaného injekcí *Borrelia afzelii*, by bylo potřeba analyzovat další vzorky tkání z různých jedinců.

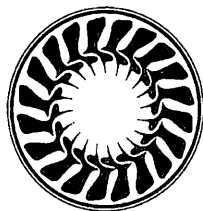
Předložená diplomová práce splňuje požadavky kladené na diplomové práce na Přírodovědecké fakultě JU, a proto ji doporučuji k obhajobě.

Návrh na klasifikaci diplomové práce: velmi dobře


Podpis oponenta diplomové práce

V Českých Budějovicích dne 15. 5. 2018

Stupeň klasifikace	výborně	velmi dobře	dobře	nevyhověl
--------------------	---------	-------------	-------	-----------



RNDr. Veronika Urbanová, Ph.D.
Biologické centrum AV ČR, v.v.i.
Parazitologický ústav
Branišovská 31
370 05 České Budějovice

Oponentský posudek na magisterskou práci Bc. Terezy Štajnerové

„Vliv klíštěcích slin na vývoj zánětu indukovaného boreliemi v kůži myši“

V práci autorka řeší problematiku vlivu klíštěcích slin na vývoj zánětu v myší kůži indukovaného přítomností spirochét *Borrelia afzelii*. Autorka si během práce osvojila imunohistochemické metody, kde vyzkoušela různé druhy fixází, naučila se ze získané myší tkáně připravit histologické řezy, a ty nadále zpracovat pro mikroskopické vyhodnocení.

Práce je přehledná, s minimem překlepů. Má 55 stran a je členěna na několik kapitol (literární přehled, cíle práce, materiál a metody, výsledky, diskuze, závěr, seznam zkratk a literatura). Autorka splnila vytyčené cíle práce a výsledky sepsala a diskutuje s množstvím literárních zdrojů.

U jednotlivých kapitol mám tyto připomínky a otázky:

Literární přehled je celkem rozsáhlý, ale je čtivý, přehledný a srozumitelný. Mám jen tuto připomínku: Autorka píše, že slinné žlázy jsou umístěny v ústní oblasti klíštěte (kapitola 1.3, str. 12). Jak autorka přišla na pojem „ústní oblast“? Může doplnit citaci?

Vědeckým standardem je, že pokud se v textu použije latinský název např. *Ixodes scapularis*, *Borrelia afzelii* aj. tento název se celý napíše pouze poprvé, kdy je v textu zmíněn, poté se píše již zkráceně *I. scapularis*, *B. afzelii*.

Kapitola materiál a metody je poměrně přehledně napsaná, ale mám zde několik doplňujících dotazů:

- 1) Autorka v práci použila spirochéty *B. afzelii* (kapitola 3.2, str. 20). O jaký kmen se přesně jednalo?
- 2) Autorka v pilotních experimentech pro fixaci myší tkáně použila několik druhů fixází. Jaká fixáž byla nakonec použita pro fixaci myší tkáně ve finálních experimentech? Byly vzorky ze všech experimentálních skupin fixovány stejně? Dále mi chybí podrobnější popis při přípravě histologických vzorků (kapitola 3.4, str. 21). Autorka detailně popisuje, jaké chemikálie byly použity, ale chybí mi zde jednotlivé časové intervaly během odvodňování vzorků, při jejich odparafinování a rehydrataci.
- 3) V experimentech bylo použito pět C57Bl myší, které byly rozděleny do třech skupin (2-2-1). Každá z myší ve skupině byla použita pro pokus v jiném časovém intervalu. Tímto tedy autorka získala 1 myš na 1 pokusnou skupinu. Proč nebyly na skupinu použity nejméně tři myši, aby autorka získala přesnější a lépe publikovatelné výsledky?
- 4) V kapitole 3.8 autorka popisuje indukci zánětu. Vzniká zánět pouze v místě vpichu nebo i v okolní oblasti? Byl vždy vzorek kůže odebrán ze stejné oblasti u jednotlivých myší? V případě, že byl vzorek tkáně odebírán z místa vpichu, jak bylo toto místo označeno, aby byla odebrána „správná“ oblast kůže 4 nebo 72 hodin po indukci zánětu?

Výsledky jsou na diplomovou práci poměrně stručné. Na histologických řezech je popsán rozdíl v zánětlivé odpovědi myši po vpichu samotných *B. afzelii* nebo *B. afzelii* společně se slinami klíštěte *Ixodes ricinus*. I zde mám na autorku několik dotazů:

- 1) Na obrázku 5 je zobrazen řez myší kůží s indukovaným zánětem 72 hodin po vpichu *B. afzelii* a klíštěcích slin. Proč není pro lepší porovnání ukázán i řez ze stejného časového intervalu po intradermální injekci samotných borélií a BSK-H media?
- 2) V kapitole 4.2 jsou na histologických preparátech detekovány efektorové buňky - neutrofily a makrofágy v myší kůži pomocí specifických fluorescenčních protilátek. Na řezech bez pozitivního signálu = kontrola (obr. 8D, 9D) se na snímcích myších tkání nedá orientovat. Proč autorka nedobarvila jádra buněk např. pomocí DAPI nebo nepořídila snímek řezů pod Nomarského diferenciálního kontrastem pro snazší orientaci?
- 3) Na obr. 9 autorka ukazuje imunolokalizaci neutrofilů v myší kůži 4 hodiny po indukci zánětu. Rovněž zde ukazuje kontrolní vzorek po vpichu samotného BSK-H media (9D). Dle mého autorka nemohla hodnotit množství neutrofilů v tkáni 4 hodiny po vpichu BSK-H media, neboť měla jedinou kontrolní myš a z té získala vzorky až 72 hodin po indukci zánětu. Co je tedy vzorek zobrazený na obrázku 9D?
- 4) V kapitole 4.3 je statisticky vyhodnoceno množství efektorových buněk infiltrovaných do místa zánětu. Proč do grafu není zahrnuta i kontrolní skupina (injikace BSK-H media)?
- 5) Proč autorka hodnotila množství neutrofilů po 4 hodinách a počet makrofágů po 72 hodinách? Mělo by smysl hodnotit obě skupiny (neutrofily i makrofágy) v oba časové intervaly?

V diskuzi autorka srovnává funkci neutrofilů a makrofágů během zánětu. Dále celkem podrobně srovnává vliv klíštěcích slin na imunitu hostitele a přenos patogenů. Je zde popsáno, že samotné klíštěcí sliny mohou mít i prozánětlivé účinky, přičemž závisí na několika různých faktorech. Tento fakt mi přijde celkem zajímavý. Neuvažovala autorka o zařazení další experimentální skupiny, kdy by experimentální myši injikovala pouze klíštěcími slinami?

Závěrem:

Autorka zvládla základní metody mikroskopických technik včetně imunolokalizací. Získala celkem jasné výsledky, ale v magisterské diplomové práci bych čekala výsledky, které by byly obsáhlejší a lépe zpracované. Myslím, že v diplomové práci je dostatek prostoru i na uvedení případných negativních výsledků, v případě že autorka nějaké měla. Ukázala by tak, kolik práce se skutečně skrývá za dosaženými výsledky.

Přes všechny připomínky jsem přesvědčena, že předložená práce splňuje nároky Přírodovědecké fakulty JU na magisterskou práci, proto ji doporučuji k obhajobě, jako jeden z předpokladů udělení titulu Mgr. Výslednou známku navrhu v závislosti na ústní obhajobě.

V Českých Budějovicích 16. 5. 2018

Veronika Urbanová