



Oponentský posudek na diplomovou práci Bc. Barbory Dvořákové „Charakterizace imunitní odpovědi hostitele proti slinám flebotomů“

Předložená diplomová práce se zabývá analýzou imunitní odpovědi myší kmene BALB/c v kontextu protektivního efektu předinfekční imunizace na rozvoj leishmaniózy.

Práce je klasicky členěná, v úvodní kapitole autorka shrnuje současné znalosti Leishmanióze a jejích vektorech, dále podrobně rozebírá imunitní odpověď spojenou s touto infekcí. Práce zpočátku trpí jazykovou neobratností („protistojně působící imunitní reakce“, „vlivně formují“), která je často typická pro diplomové práce ale důležité je, že se formální stránka dále v diplomové práci zlepšuje. Literární přehled pečlivě zpracovává vše co souvisí s tématem diplomové práce, je velmi dobře dokumentován shrnujícími tabulkami a obrázky, takže celkově jej považuji za velmi zdařilý.

V kapitole Materiál a metody jsou vysvětleny použité myší modely a metodiky. Pracovní postupy jsou popsány velmi podrobně, a umožňují bezproblémové zopakování experimentů podle daných protokolů. Autorka v kapitole 3.2.3 uvádí, že „myši byly hluboce uspány a byla jim odebrána slezina“, doufám že myši byly před odběrem sleziny usmrceny. Můj zásadní komentář k použitým metodám zahrnuje vysokou koncentraci slezinných buněk použitých pro kultivaci. 1×10^6 buněk ve 200 ul je opravdu hodně a buňky byly navíc kultivovány po dobu 9 dnů. Doplnění média o 50ul není dostatečné a tato koncentrace může vzhledem k vyčerpání látek v médiu a kontaktní inhibici negativně ovlivnit výsledky experimentu. V další části 3.4.4 byla použita, koncentrace 1×10^6 slezinných buněk ve 100 ul ve 24 jamkové destičce. Předpokládám, že udaný objem média je spíše překlep? V metodické části je také ukázána gatovací strategie pro analýzu populací imunitních buněk pomocí průtokové cytometrie, což vítám. Správně by u gatovací strategie měly být uvedeny i FMO kontroly, aby mohl čtenář práce posoudit zda gatování bylo provedeno správně, což u některých populací není zcela jasné. Co vedlo autorku k tomu useknout část populace u analýzy singletů? (SSC-Hvs SSC-A)? I v této části práce jsou velmi vhodně uvedeny schémata jednotlivých experimentů a několik tabulek shrnující použité chemikálie a postupy.

V diplomové práci si autorka vytyčila tři základní cíle:

1. otestovat možné využití dlouhodobě imunizovaných myší pro in vitro testy produkce protilátek
2. popsat imunitní odpověď myši, která se podílí na protektivním efektu slin
3. popsat imunitní odpověď myši v kontextu infekce *Le. major* a různých imunizačních schémat

V průběhu práce Barbora Dvořáková udělala spoustu experimentální práce, zahrnující celou řadu metodických přístupů. Přesto, že ne všechny experimenty fungovaly podle přání, je objem vykonané práce vysoký. Celkově jsou data shrnuta ve 44 obrázcích, což dokumentuje výše zmíněné a také snahu autorky důkladně porovnat získané výsledky. Což se jistě povedlo a pečlivost autorky v tomto ohledu hodnotím velmi pozitivně. Drobnou výtkou je, že popisy jsou nad obrázky, což vybočuje ze zavedeného zvyku a je tudíž trochu matoucí, jinak je formální úroveň obrázků velmi dobrá. Mám zde několik doporučení, k použitým metodickým přístupům, které ovlivňují výsledky studií. Detekci protilátek a cytokinů autorka dokumentuje jako výsledky absorbance. Vzhledem k tomu, že jsou v diplomové práci srovnávány výsledky ze dvou nezávislých pokusů, není jasné zda byla tato měření prováděna zároveň a na jedné destičce. Pokud ne, bylo by vhodné použít standard, případně referenční vzorek na všech měřených destičkách, které by umožnily porovnat získané výsledky, vzhledem k tomu že absorbance může být při jednotlivých měřeních různě vysoká. Lepší možnost porovnání by umožnila také stimulace daných vzorků pomocí superantigenů (LPS/ConA/PMA), které by mohly sloužit jako pozitivní kontrola (referenční vzorek). IL-10 může být při kultivaci produkován později než po 48h, v závislosti na daných kultivačních podmínkách, což by mohlo být alternativním vysvětlením nízkých detekovaných hladin.

Diskuse je pečlivá a rozsáhlá. I když k prvnímu cíli se jedná spíše o shrnutí výsledků, další části jsou diskutovány velmi dobře v kontextu světové literatury. Diskuse má celkem 13 stran což svědčí o důkladném přístupu autorky a úspěšné snaze konfrontovat se s někdy protichůdnými výsledky.

Literární zdroje zahrnují 158 citací, jsou většinou ve správném formátu, trochu rušivý je odskok, který se najednou objeví do citace 100.

Autorka v předložené diplomové práci prokázala znalost řady metodických přístupů, vypořádala se se všemi vytyčenými cíli, získala zajímavé výsledky, které dokázala (včetně některých diskrepancí v získaných datech) úspěšně diskutovat. Výše uvedené připomínky významně nesnižují kvalitu diplomové práce, předloženou práci doporučuji k obhajobě a kladnému ohodnocení.

Otázky:

1. V dikusi autorka uvádí, že „eozinofily jsou etablovány jako popravčí leishmanií“ a fungují prostřednictvím různých mechanismů. Můžete popsat, jak jsou *Leishmanie* zabíjeny prostřednictvím obsahu granulí eozinofilů a extracelulárních sítí?
2. Uvádíte, že střevní mikrobiom flebotoma je faktorem modulujícím průběh infekce. Byly popsány rozdíly v mikrobiomu flebotomů v různých oblastech výskytu? Je možné předpokládat, že se mikrobiom flebotomů chovaných v různých experimentálních zařízeních liší, může to ovlivnit výsledky získané v různých laboratořích?
3. Ve třetí části práce byly detekovány tři cytokiny IFN γ , IL-4 a IL-10. Jaké další cytokiny, případně jiné rozpustné molekuly byste na základě znalosti literatury považovala za vhodné detekovat?
4. Znalosti o imunitním systému se značně rozšiřují, je popisován významný vliv minoritních populací imunitních buněk (které jsou typicky přítomné v tkáních), na různá onemocnění. Podílejí se takové populace (například $\gamma\delta$ T lymfocyty, nebo ILC buňky) na průběh leishmaniózy?

V Praze 23.8.2024



Doc. RNDr. Magdaléna Krulová, Ph.D.
Katedra buněčné biologie, Přf UK