Posudek na diplomovou práci Bc. Lucie Pohankové „Protilátková odpověď na sliny flebotomů“

Práce se zabývá protilátkovou odpovědí myší na sliny *Phlebotomus papatasi* a stanovuje si tři hlavní cíle.

1. Zjistit dynamiku protilátkové odpovědi a charakterizovat antigeny slin

2. Otestovat zkříženou reaktivitu s antigeny slin jiných krev sajících členovců

3. Zjistit vliv imunizace opakovaným sáním flebotomů na vývoj leishmaniové léze.

Hned v úvodu je třeba konstatovat, že všechny tři cíle byly splněny. Autorka se věnovala dlouhodobě studované problematice v laboratoři prof. Volfa, imunitní odpovědi na sání flebotomů. Práce má 84 stran a je klasicky členěná na Úvod, Literární přehled, Metodiku, Výsledky, Diskusi a Souhrn. Nechybí přehled zkratek. Podrobný literární přehled popisuje na 20 stranách složení slin krev sajících členovců, vliv slin na hostitele a protilátkovou odpověď proti slinám. Opírá se celkem o 146 citací.

K Přehledu mám následující otázky a komentáře:

Str. 11: *jak se uplatňují sliny ve vyhledávání ideálního místa bodnutí?*

Str. 16, Obr. 1: popis křivek je obráceně, promastigoty v přítomnosti lyzátu (plný čtvereček) vyvolávají větší léze než bez lyzátu.

Str. 23 nahoře: *co znamená z hlediska vývoje imunitní odpovědi indukce protilátek IgG1 (Th1/Th2 polarizace)?*

Str. 23, Obr. 3: *co je Control na obr. 3B, když v legendě jsou kontrolní myši „imunizovány“ PBS?*

Materiál a metodika podrobně popisují řadu metod od chovu flebotomů, přes pitvy slinných žláz, imunizaci a infekci myší leishmaniemi po imunochemické metody (ELISA, western blotting a immunoblotting), čipovou elektroforézu a statistické metody.

K této kapitole mám následující připomínky:

Str. 33: u firmy, která má jednu lokalizaci se tato uvádí (AnLab Praha)

Str. 36: *co znamená „vymražení“ leishmanií z kryobanky?*

Str. 37: *proč se tak výrazně (až 25x) lišilo množství slin pro potažení jamek na ELISA test? Proč není množství antigenu vyjádřeno v μg proteinu?*

Str. 37: *čím byla značena sekundární protilátka?*

Str. 38: *jaké bylo úplné složení substrátového roztoku (OPD nebo TMB)?*

Str. 39: *Proč je mezi použitými roztoky pro western blot uveden odbarvovací roztok pro amidočerň? Western blot je výsledek testu, metoda se jmenuje Western blotting.*

Kapitola Výsledky je velmi podrobně zpracovaná. Výsledky jsou dobře graficky zdokumentovány. V souvislosti s výsledky se nabízí otázka, *proč nebyly stanoveny protilátkové podtřídy IgG2a a IgG4?*

Velmi podrobná Diskuse zahrnuje téměř 9 stran. Autorka porovnává dosažené výsledky s výsledky kolegů z laboratoře i zahraničních autorů. Jednoznačně bylo prokázáno, že opakované sání flebotomů vyvolává tvorbu specifických protilátek proti antigenům slin, zejména v podtřídě IgG1. Zdá se, že indukované protilátky jsou specifické pro konkrétní druh flebotoma a nereagují s antigeny jiných krev sajících členovců včetně klíšťat. Naproti tomu s antigeny slin *Phlebotomus papatasi* reagovaly i protilátky indukované slinami *P. perniciosus* nebo dokonce slinami klíštěte *Ixodes ricinus*. *Čím by autorka vysvětlila tento rozdíl?*

Autorka též prokázala vliv imunizace slinami na velikost kožních lézí po inokulaci leishmanií se slinami. V diskusi zmiňuje, že opakované sání neinfikovaných flebotomů vede k vývoji buněčné imunity která chrání před leishmaniovou infekcí. *Může autorka vysvětlit, o jaký typ buněčné imunity jde a jak by ji prokázala?*

K formální stránce diplomové práce.

Diplomová práce je psána česky, i když autorka je podle jména Slovenka. To je zřejmě důvodem obrovského počtu chyb ve shodě přísudku s podmětem. I když vím, že slovenský pravopis má jiná pravidla, nebylo by snad problémem nechat si gramatiku zkontrolovat některým z českých kolegů. Neznalost české gramatiky rovněž neomlouvá špatnou angličtinu abstraktu.

Závěr: přes výše uvedené nedostatky prezentovala Lucia Pohanková ve své diplomové práci kvalitní výsledky, které nepochybně splňují požadavky na diplomovou práci a mohou být podkladem pro její úspěšné obhájení. Práci hodnotím jako **velmi dobrou**.

V Českých Budějovicích 4. 6. 2014

Prof. RNDr. Jan Kopecký, CSc.