



Veterinární a farmaceutická univerzita Brno
Fakulta veterinárního lékařství
Ústav parazitologie
Palackého 1/3, 612 42 Brno
www.vfu.cz/parazit
telefon 541 562 262, fax 541 562 266

Oponentský posudek na disertační práci RNDr. Bohumila Saka

Doktorská disertační práce RNDr. Bohumila Saka „**Mechanismy imunitní odpovědi na infekci mikrosporidií *Encephalitozoon cuniculi* in vivo: role humorálních protilátek**“ sestává celkem z 89 stran textu a její podstatnou část tvoří publikované práce, popř. rukopisy publikací. Předložená disertační práce je v mnoha rysech podobná disertační práci RNDr. Pavlína Branfuchsové-Tinavské, Ph.D. „**Studium mechanismů imunitní odpovědi při infekci mikrosporidií *Encephalitozoon cuniculi***“ (2002) a disertační práci RNDr. Jiřího Saláta, Ph.D. „**Imunitní odpověď na infekci mikrosporidii rodu *Encephalitozoon***“ (2003). Společným jmenovatelem všech prací je nejenom problematika imunitní odpovědi na infekci mikrosporidii, ale také celková struktura disertační práce. Tuto skutečnost hodnotím jako výraz koncepčnosti a postupného rozvíjení dané problematiky. Velmi kladně také hodnotím, že předložená disertační práce byla podporována grantovými projekty a že se RNDr. Bohumil Sak aktivně zúčastnil všech „rituálů“ spojených s grantovým systémem při financování vědy a výzkumu.

Doktorská disertační práce RNDr. Bohumila Saka je psána částečně v jazyce českém a částečně v jazyce anglickém. Podle použitého jazyka lze práci rozdělit na dvě části. Český text zahrnuje části literární přehled v první části disertační práce, diskusi a závěr. Prostřední anglická část práce sestává z 3 publikací, (označených 2.1., 2.2, 2.5), jednoho rukopisu přijatého do tisku (2.3) a jednoho rukopisu zasláného do redakce časopisu (2.4). RNDr. Sak je prvním autorem dvou publikací (2.2., 2.3.), které obsahově odpovídají názvu disertace a je spoluautorem dalších tří prací (2.1., 2.4., 2.5). Detailnější pohled na publikované práce a rukopisy nabízí zamyšlení o koncepci a struktuře disertační práce. Vzhledem k tomu, že v disertaci nejsou ve formě samostatné kapitoly jednoznačně formulovány cíle disertační práce, je na oponentovi, aby posoudil sám, do jaké míry souvisí jednotlivé předložené práce a rukopisy s vlastním názvem disertace. Určitou pomocí mu mohou být komentáře na úvod kapitoly *Výsledky* (str. 21-22). Tyto komentáře jsou dle mého názoru důležité, protože např. objasňují zařazení publikované práce (2.5.) (s poznámkou „dodatek“), která obsahuje výsledky magisterské práce RNDr. Saka. Bez objasnění by uvedení výsledků magisterské práce do práce disertační bylo přinejmenším nezvyklé. Takto však představuje podporu koncepčnímu přístupu k dané problematice.

Další poznámka se týká dvojjazyčnosti textu disertace. Po prostudování celého textu disertace se domnívám, že by bylo vhodnější sepsat celou disertaci v anglickém jazyce. Bez ohledu na obsah disertační práce považuji kombinaci českého a anglického jazyka za nepřilíš vhodnou a v případě komentovaného souboru publikací preferuji předložení práce pouze v angličtině.

Předložení publikovaných výsledků v doktorské disertační práci staví oponenty do poněkud nepříjemné situace. Obtížně se hodnotí kvalita disertační práce, když prioritní výsledky byly publikovány v mezinárodních impaktovaných časopisech po regulárním recenzním řízení? Proto se v posudku soustředím spíše na komentář ke zvolenému tématu a zhodnocení vlastních výsledků.

Téma předložené disertační práce považuji za aktuální a také za atraktivní. Oceňuji strategii adoptivních přenosů lymfocytů před infekcí mikrosporidii v kombinaci s využitím myši s defektními geny pro syntézu cytokinů a různých způsobů infekce za současného využití výsledků magisterské práce (anti-exospore monoclonal antibody). Tímto spojením došlo k originálnímu kombinaci experimentálních metod pro studium buněčné imunity i humorální imunity. Jak jsem již naznačil v úvodu, domnívám se, že práce RNDr. Saka je názorným příkladem postupného, cílevědomého a hlavně týmového přístupu k řešení problematice. Samozřejmě je nutné v tomto případě také vyzdvihnout úlohu školitele a všech spolupracovníků. Neodpustím si však dotaz, zda výše zmíněná kombinace metodických postupů byla cíleně plánována nebo zda je výsledkem „shody okolností“.

Ke kapitole *Výsledky* mám následující dotazy a připomínky:

- prosím o upřesnění metodického zaměření/podílu autora disertace v rámci jednotlivých publikací/rukopisů
- prosím o vysvětlení pořadí jednotlivých rukopisů a publikací
- autor disertace pracoval s monoklonální protilátkou proti exospoře mikrosporidií; lze předpokládat jiné výsledky, kdyby byla k dispozici monoklonální protilátka proti sporoplasmě *E. cuniculi*?
- jak by autor disertace posoudil význam specifických protilátek při jiných způsobech infekce mikrosporidii (např. oční infekce mikrosporidii nebo svalové mikrosporidiiózy)?

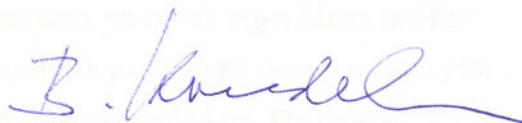
Následná část *Diskuse* na osmi stranách srovnává výsledky s dříve publikovanými daty. Tato část disertační práce je psána srozumitelně a charakterizuje význam jednotlivých složek imunitní odpovědi na infekci mikrosporidii. *Diskuse* je sepsána velmi komplexně a pokud by byla sepsána v angličtině, mohla by být publikována jako aktualizovaná souhrnná práce o imunitních mechanismech při infekci savčích hostitelů mikrosporidii. Na druhou stranu konstatuji, že v takto pojaté *Diskusi* se trochu „ztrácí“ vlastní výsledky autora disertace.

Další částí práce je kapitola *Závěry*, ve které se opakují v českém jazyce výsledky jednotlivých rukopisů a publikovaných prací. Ve formě pěti hlavních odstavců jsou v této části disertační práce shrnuty hlavní dosažené výsledky. Na závěr této části disertační práce je v podobě šestiřádkového odstavce formulována role protilátek při infekci mikrosporidii. K této formulaci přispěl svými výsledky také RNDr. Bohumil Sak.

Formální úprava disertační práce RNDr. Bohumila Saka je na standardní úrovni s minimálním počtem překlepů a formulačních nepřesností.

Závěrem oponentského posudku konstatuji, že výsledky zpracované v doktorské disertační práci a RNDr. Bohumila Saka hodnotím pozitivně. Je zřejmé, že disertační práce je výsledkem řešení konkrétního vědeckého úkolu a obsahuje řadu prioritních výsledků. Splňuje tím požadavky kladené na doktorskou disertační práci, které jsou formulovány ve Studijním a zkušebním řádu BF JU. Doktorskou disertační práci RNDr. Bohumila Saka proto doporučuji k obhajobě.

V Brně 28. ledna 2006



Prof. MVDr. Břetislav Koudela, CSc.

koudelab@vfu.cz, koudela@paru.cas.cz

Oponentský posudek na doktorskou dizertační práci Mgr. B. Saka

„Mechanismy imunitní odpovědi na infekci mikrosporidií *Encephalitozoon cuniculi* in vivo: role humorálních protilátek“.

Téma dizertace vychází z několika skutečností. Mikrosporidie *Encephalitozoon cuniculi* je jednou z nejčastějších savčích mikrosporidií, infekce jí způsobené se vyskytují i u člověka. Řada těchto infekcí je díky imunodeficienci hostitelů patentních, ale přítomnost sérových protilátek ukazuje, že latentní asymptomatické infekce jsou relativně časté. Je to také první, a zatím jediná mikrosporidie, jejíž genová sekvence je známá. Další skutečností je, že *Encephalitozoon cuniculi* je snadno pěstovatelná *in vitro* a *in vivo*, je oblíbeným laboratorním modelem a imunitní reakce jí vyvolávané se staly předmětem řady prací pracovníků Parazitologického ústavu. Práce Mgr. B. Saka a jeho spoluautorů na tyto práce navazují a do určité míry je kompletují.

Struktura práce. Práce má relativně obsáhlý literární přehled charakterizující obecně mikrosporidie, popisující jejich taxonomii, morfologii, životní cyklus a parazito-hostitelské vztahy. Dále jsou popisovány lidské mikrosporidiové infekce, jejich původci a onemocnění jimi vyvolávaná. K vlastnímu tématu dizertace se pak literární úvod přibližuje v kapitole "Mikrosporidioza a imunitní odpověď", která v podstatě shrnuje současné znalosti o struktuře a funkci savčího imunitního systému a stav znalostí o reakcích imunitního systému na mikrosporidiové infekce. Jelikož významnými pomocníky při výzkumu reakcí savčího imunitního systému na mikrosporidiovou infekci jsou různé kmeny myši s genovými defekty imunitního systému, je jejich přehled zařazen do úvodní kapitoly.

Další, klíčová část práce sestává z 5 prací, publikovaných (2 práce), či přijatých do tisku (1 práce), či zasláných do tisku (1 práce) v rozmezí let 2004-2005. V těchto pracích je dizertant jedním z autorů a jeho významná participace je potvrzena v písemném stanovisku spoluautorů.

Následující Diskuse zasazuje výsledky právě zmíněných prací do kontextu celkových znalostí o reakci savčího organismu na infekci mikrosporidií *Encephalitozoon*. Závěr práce shrnuje dosažené výsledky, které považují za významné a které jsou metodicky solidně podloženy. Odpověď savčího imunitního systému na infekci mikrosporidii je značně komplexní. Jedním z nejdůležitějších zjištění vyplývajících z prací v předkládaném souboru je potvrzení dříve popsání fenoménu že pro imunitní odpověď organismu a pro to, zda organismus mikrosporidiovou infekci přežije, je zásadní cesta, kterou se mikrosporidie dostala do těla hostitele. V experimentech běžně používaná intraperitoneální infekce se ukázala v řadě pokusných kombinací letální oproti cestě perorální. Práce v předkládaném souboru prokázaly malou protektivní účinnost humorálních protilátek a naopak prokázaly zásadní úlohu interferonu gamma a T lymfocytů. Podařilo se také prokázat významnou imunogenitu sporových obalů mikrosporidií a ochranný vliv protilátek proti těmto antigenům.

Připomínky a dotazy oponenta. Větší část mých připomínek se týká údajů mimo vlastní buď již publikované či do tisku přijaté práce, které prošly kvalifikovaným recenzním řízením a jejichž kvalita je tedy nesporná. Jediná z uvedených prací byla odeslána do tisku, ale neprošla dosud recenzním řízením.

Prosím, aby během obhajoby dizertant odpověděl na mé následující dotazy.

Ve všech experimentech provedených v rámci práce byl použit kmen *Encephalitozoon cuniculi* EC2. Ke kterému genotypu tento kmen patří? Je možné se domnívat, že různé genotypy *Encephalitozoon* by se mohly lišit imunitní odpovědí, kterou vyvolávají a to v závislosti na svém typickém hostiteli?

Jak vyznívá celkové srovnání imunitních pochodů, které následují po infekci mikrosporidii s reakcemi imunitního systému na jiné patogeny? Paradoxně totiž, mikrosporidie se mohou množit i v některých buňkách imunitního systému (makrofágy), a jsou to právě tyto buňky, které roznášejí mikrosporidii do tkání a orgánů hostitele. Jsou mikrosporidie díky své zvláštní intracelulární a intracytoplasmatické lokalizaci chráněny během merogoniální fáze cyklu před rozpoznáním imunitním systémem hostitele? Lze si totiž představit, že k prezentaci mikrosporidiových antigenů dochází převážně v pokročilejší fázi infekce, kdy se vytvořené spory, či jejich obsah ocitají v mezibuněčném prostředí.

Proč intraperitoneální infekce vedou u některých imunodefektních myší ke smrti, zatím co k tomu při perorální infekci nedojde?

Několik prací publikovaných pracovníky PaU ukázalo, že oko je efektivní branou pro infekce mikrosporidii a že aplikace spor na povrch oka vede k rozvinutí systémové infekce organismu. Literární úvod dizertace tuto skutečnost pomijí. Existují vůbec nějaké údaje

o imunologii infekcí získaných přes oko?

Na str. 2 je uvedeno, že u amitochondriálních protistů nebyla dokázána fúze gamet, avšak u mikrosporidií ano. Za prvé bych zde chtěl uvést svůj osobní názor, že důkazy existence gamet u mikrosporidií jsou velmi nejisté. Za druhé by se měl dizertant vyjádřit k termínu "amitochondriální protista". Myslí tím protista s klasickými mitochondriemi, či také protista u kterých existují mitochondriální reliktů v podobě mitosomů? Existují vůbec opravdu amitochondriální protista?

Na str. 2 je uváděna přítomnost chitinů jako důkaz příbuznosti mikrosporidií a hub. Obecně vzato chitin nemá fylogenetickou vypovídací hodnotu, jeho distribuce je velmi náhodná a ani u hub není vždy přítomen jako dominantní prvek buněčné stěny (na př. kvasinky).

Na str. 2 jsou uvedeny znaky odlišující mikrosporidie od hub ("buněčná struktura podobná protistům", přítomnost ergosterolu v membránách, absence buněčné stěny"). Formulace těchto rozdílů je nejasná, protože jakoby říkala, že houby nemají v buněčné membráně ergosterol, což není pravda. Naopak literární údaje konstatují, že mikrosporidie ergosterol v buněčné membráně nemají. Prosím o vysvětlení a eventuelní provedení opravy v práci. Rovněž není pravda, že mikrosporidie nemají buněčnou stěnu. Elektronodenzní vrstva, která se objevuje na buňkách mikrosporidií během sporogonie je evidentně formou buněčné stěny.

Na str. 2 je uvedeno, že v současnosti jsou mikrosporidie řazeny do říše Fungi na základě sekvencí proteinů. Je tomu skutečně tak, nebo jsou to sekvence některých genů, kodujících proteiny, které vedou k těmto závěrům?

Prosím o vysvětlení nejasné formulace na str. 3 "polová trubice je tvořena ...vrstvami proteinů jež tvoří vesikuly připomínající Golgiho aparát.

Na str. 4 je uvedeno, že mikrosporidie *Enterocytozoon* má v merogonii jádra v diplokaryontním uspořádání. To neodpovídá skutečnosti.

Na str. 5 je uvedeno, že na stavbě parazitoformní vakuoly *Encephalitozoon* se podílí jak parazit tak hostitel. Prosím o doplnění literární citace k tomuto důležitému údaji.

Na str.8 jsou uvedeny případy mozkové mikrosporidie, ale není uvedeno u kterých mikrosporidií byla infekce mozku zjištěna.

Str. 9. vaskulitida má být vasculitis.

Na str. 10 je uvedeno, že primární cesta infekce mikrosporidii zahrnuje ingesci, nebo inhalaci. Není zde ale uvedeno, že experimentálně bylo opakovaně prokázáno, že je možná i infekce přes oko.

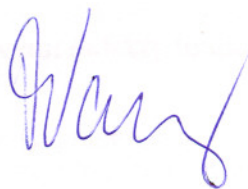
Další drobné formulační nepřesnosti, či neobratnosti jsem označil v textu a pokládám za zbytečné je v posudku specifikovat.

Závěr. Předložená práce splňuje po formální a obsahové stránce nároky na doktorské dizertační práce. Soubor prací, jenž tvoří její základ přináší hodnotné informace o reakci jednotlivých složek imunitního systému na infekci modelovou mikrosporidií *Encephalitozoon* a prokazuje schopnost dizertanta řešit náročnou vědeckou problematiku na moderní metodické úrovni. Doporučuji tedy aby předložená práce byla přijata jako podklad pro obhajobu a udělení titulu doktor.

Prof. RNDr. Jiří Vávra, DrSc.

Katedra parazitologie BF JU v Čs. Budějovicích

25.ledna 2006



Posudek na doktorskou disertační práci
Bohumila Saka
„Mechanismy imunitní odpovědi na infekci mikrosporidií
Encephalitozoon cuniculi
***in vivo: role humorálních protilátek*“**

Disertační práce Bohumila Saka má 89 stran (úvodní stránky nejsou započteny) a sestává z úvodu, literárního přehledu (20 stránek), výsledků (47 stran), diskuse (8 stran), závěrů (3 strany) a citované literatury (131 položka).

Literární přehled, na poměry českobudějovické disertace nezvykle dlouhý, nicméně tématicky velice dobře cílený, seznámí čtenáře logickou a srozumitelnou formou se základními informacemi o mikrosporidiích a mikrosporidioze s důrazem na *Encephalitozoon cuniculi* jakož i o imunitní odpovědi na mikrosporidiovou infekci, zejména o funkci mikrofágů, T lymfocytů, klíčových cytokinů a o tvorbě protilátek. Nechybí ani seznámení s experimentálními modely, na nichž byl výzkum prováděn.

Výsledky, klíčová část celé disertace, sestává z pěti autorových publikací, z nichž první a druhá vyšly ve Folia Parasitologica, třetí byla přijata do tisku v Parasite Immunology, čtvrtá byla do stejného časopisu podána a pátá vyšla v Parasitology Research; u třech z nich je Bohumil Sak prvním autorem. Jedna z prací vznikla již za dřívějších studií autora a vlastně ani není součástí disertace, myslím ale, že je správné, že byla pro úplnost také přiložena. Práce úspěšně prošly (nebo právě procházejí) náročným recenzním řízením v renomovaných časopisech, což potvrdilo jejich vysokou úroveň.

Diskuse shrnuje výsledky jednotlivých prací a konfrontuje je literárními údaji.

Závěry shrnují přehledným způsobem hlavní získané poznatky.

Literatura obsahuje citace zmiňované doktorandem v literárním přehledu a diskusi.

Aby recenzent prokázal, že celou práci se vším všudy skutečně přečetl, musí uvést seznam pravopisných a formálních chyb, nedostatků a překlepů, které při četbě odhalil. Pokud je tento seznam tak krátký jako u disertace Bohumila Saka, může to znamenat buď špatnou práci oponenta nebo dobrou práci autora (zde myslím platí druhá varianta):

Str. 2 *fůze*

Str. 25 obligátní *Sevak, Prague*

Str. 36 Při porovnání výsledků „*completely different from those of el Fakhry et al. (1998)*“ může méně soustředěný čtenář ztratit orientaci, které výsledky jsou od kterého z autorů. Užitečné vodítko: citovaný autor uvádí obsah protilátek v titrech.

Str. 44 ...*significant survival prolongation of survival was observed...*

Str. 76 *Léčba monoklonální protilátkou P5/H1 aplikovanou intraperitoneálně významně prodloužila přežívání..... zatímco v případě intraperitoneální infekce...*

Práce je logicky členěna a srozumitelně napsána. Z důvodu nedostatku jiných formálních nedostatků si dovoluji kritizovat samotný název doktorské disertační práce - nelíbí se mi podtitul „*role humorálních protilátek*“. Jednak proto, že „*celulární protilátky*“ ztěžují budou mít nějakou roli, ale hlavně proto, že tento název nevystihuje skutečný obsah práce. Publikace tvořící jádro disertace nepojednávají výhradně o protilátkové odpovědi – autor se zabývá i rolí klíčových cytokinů, T lymfocytů, NK buněk... Pointou práce, která, ačkoliv to autor ze skromnosti příliš nezdůrazňuje, vyvstává na několika místech, je, že, ačkoliv literární údaje při infekci intracelulárními organismy zdůrazňují rozhodující úlohu buněčných reakcí, při

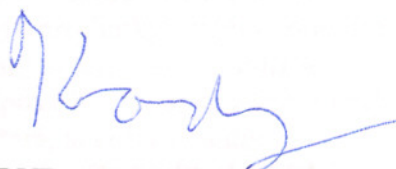
imunitní odpovědi na infekci *Encephalitozoon cuniculi* jsou humorální a celulární mechanismy navzájem provázány a k nastolení projektivní imunity je za přirozených podmínek nezbytná kooperace obou složek. A to by se mělo obrazit i v názvu disertace.

Ani po věcné stránce nelze doktorandovi nic zásadního vytknout. Prokázal, že má dobrý přehled o sledované problematice, dokáže koncepčně plánovat experimenty, zvládá provádění náročných imunologických testů a výsledky dokáže adekvátně vyhodnotit. Tyto schopnosti doktoranda nejlépe dokládají jeho publikace v impaktovaných časopisech.

Bohumilu Sakovi bych si dovolil položit tyto dotazy:

1. Můžete, prosím, při obhajobě shrnout, jaká je podle nejnovějších poznatků role protilátek proti *Encephalitozoon cuniculi* a kde všude se při imunitní odpovědi protilátky uplatňují ?
2. Jakými mechanismy ovlivňuje přítomnost/nepřítomnost IL-12 a IFN- γ tvorbu protilátek proti *Encephalitozoon cuniculi* ?
3. Proč se tak výrazně liší odpověď na blízce příbuzné druhy *Encephalitozoon cuniculi* a *Encephalitozoon intestinalis* ?
4. Do jaké míry se Vaše zjištění o dynamice protilátkové odpovědi u myši shodují s údaji o tvorbě protilátek při mikrosporidiózách člověka ?
5. Součástí doktorské práce není souhrnná kapitola o metodice a v publikacích jsou údaje o jednotlivých metodách velice stručné. Proto bych se chtěl zeptat na několik detailů ohledně ELISA testu na stanovení IgA, IgG a IgM proti *Encephalitozoon cuniculi*:
 - a) Jaký byl systém vyjadřování kvantitativních výsledků? V příslušné publikaci je v popiskách ke grafům uvedeno, že obsah protilátek je v % NCC (koncentrace protilátek u negativní kontroly), v metodice že „*absolute IgA, IgG and IgM concentrations were calculated on the basis of optical density of positive controls containing known amount of antibodies*“.
 - b) Nejsou hladiny protilátek v séru poněkud nízké ? Maximálně bylo dosaženo čtyřnásobku negativní kontroly u IgG, u IgM a IgA se horkotěžko přibližují dvojnásobku. Dle odborníků na ELISA testy (Dr. Petr Mančal) by měla hranice positivity ležet někde alespoň mezi dvojnásobkem a trojnásobkem výsledků negativních vzorků. Citovaní El Fakhry et al. uvádějí titry 1:1 000 – 1:19 000. Nemohla výsledky poznamenat kompetice protilátek jednotlivých tříd ?
 - c) Proč byla dle Vašeho názoru protilátková odpověď v extraktu ze stolice dynamičtější než v séru ?
 - d) Velice mne zaujalo, že při reinfekci (na rozdíl od protilátek tříd IgG a IgA) se nezopakovala odpověď protilátek třídy IgM v séru. Byl tento jev popsán i při odpovědi na jiné druhy mikrosporidií ?

Závěr: Jelikož práce Bohumila Saka „Mechanismy imunitní odpovědi na infekci mikrosporidií *Encephalitozoon cuniculi* *in vivo*: role humorálních protilátek“ splňuje všechny požadavky kladené na doktorskou disertaci, doporučuji její kladné přijetí.



RNDr. Petr Kodym, CSc.

V Praze, dne 6. února 2006