

**Posudek na magisterskou diplomovou práci bc. Jiřího Jelínka
„Vliv interferonu gama (IFN- γ) a specifických polyklonálních protilátek na průběh
experimentální perorální infekce *Encephalitozoon cuniculi* in vivo“**

Téma diplomové práce zapadá do dlouhodobého projektu výzkumu imunitní odpovědi na *Encephalitozoon cuniculi*; Bc. Jiří Jelínek navazuje na předchozí studie a doplňuje další důležité údaje do mozaiky poznání imunity proti mikrosporidiím. Práce byla podpořena grantem GAČR.

Magisterská diplomová práce Jiřího Jelínka má 46 stran. Je uvozena jedenáctistránkovým literárním přehledem, shrnujícím základní údaje o mikrosporidiích, *Encephalitozoon cuniculi* i o imunitní odpovědi na mikrosporidiovou infekci. Literární přehled je vsutku přehledný, je směřován k tématu vlastní práce a není zahlcen balastními údaji. Cíle práce jsou formulovány jasně a jednoznačně a hned je třeba předeslat, že byly beze zbytku naplněny. Použitý materiál a metody jsou popsány na 10 stránkách tak, že je podle návodu možno pokusy reprodukovat. Jasně jsou i výsledky (7 stran), které jsou dobře patrné i ze 7 grafů. Pouze způsob, jakým jsou srovnávány a statisticky vyhodnocovány hladiny IgG anti-*E. cuniculi* (str. 27, 33, graf 7), byl poněkud zamlžen v temnotách black boxu statistického software. V diskusi (4 stránky) zasazuje autor zjištěné poznatky do kontextu dříve publikovaných znalostí o imunitní odpovědi proti mikrosporidiím a závěry, ke kterým dospěl, uvádí v souhrnu. Práci doplňuje seznam použitých zkratk a seznam 82 publikací citovaných v textu.

Po jazykové stránce je práce kvalitní, je napsána povětšinou logicky a srozumitelně, formulačních i pravopisných chyb je méně než bývá v diplomových pracech zvykem. Například na str. 12, místo formulace, že byl *Encephalitozoon cuniculi* pojmenován Levaditím a spol. v roce 1923, by bylo lepší uvést, že organismus byl popsán. Hrubé chyby ve shodě přísudku s podmětem jsem odhalil na str. 12 a 28 a tu a tam by bylo třeba doplnit čárky v souvětích.

I po věcné stránce magisterská diplomová práce udržuje vysoký standard, charakteristický pro práce vzešlé z laboratoře Doc. RNDr. Jana Kopeckého, CSc. Přináší celou řadu nových poznatků, které by stálo za to publikovat ve kvalitním časopise.

Diplomantovi bych si dovolil položit tyto otázky:

1. Mohl byste, prosím, upřesnit informaci o tom, že mikrosporidie jsou intracekulárními parazity prvoků (str. 6) ?
2. Kdybyste seřadil zkoumané složky imunitní odpovědi myši proti *Encephalitozoon cuniculi* podle jejich významu pro přežití hostitele, jaké by bylo jejich pořadí? Jak byste toto pořadí komentoval ?
3. Existuje terapie, která by SCID myši infikované *Encephalitozoon cuniculi* udržela trvale při životě (tj. až do smrti)? Jaký by asi byl průběh při kombinaci více způsobů terapie nebo při jejich opakované aplikaci ?
4. Ze srovnání grafů 3 a 5 se zdá, že IFN- γ , syntetizovaný v Českých Budějovicích, měl na infikované myši lepší ochranný efekt než srovnatelný komerční produkt. Pokud tomu tak skutečně je, čím si tento rozdíl vysvětlujete ?
5. Sérum infikovaných myši bylo skladováno při -75°C (str.22) a ne při -20°C , jak jsou zpravidla ukládána běžná séra. Je pro to nějaký zvláštní důvod ?
6. Z grafu 7 je zjevné, že i myši, které netvoří vlastní IFN- γ , jsou schopné tvořit významné hladiny anti-mikrosporidiových IgG. Je tvorba specifických protilátek u IFN- γ knokautovaných myši nižší nebo stejná v porovnání s odpovědí myši schopných tvořit IFN- γ ?

**Závěr: Doporučuji, aby studie Bc. Jiřího Jelínka
„Vliv interferonu gama (IFN- γ) a specifických polyklonálních protilátek na průběh
experimentální perorální infekce *Encephalitozoon cuniculi in vivo*“ byla přijata jako
magisterská diplomová práce a aby byla příznivě hodnocena.**



V Praze, dne 23.5.2007

RNDr. Petr Kodym, CSc.

**Posudek na magisterskou práci Bc. Jiřího Jelínka:
„Vliv interferonu gama (IFN- γ) a specifických polyklonálních protilátek na průběh
experimentální perorální infekce *Encephalitozoon cuniculi in vivo*“**

Předložená práce se zabývá tematikou imunitní odpovědi na mikrosporidiovou infekci, která představuje závažnou, život ohrožující komplikaci u imunodeficientních pacientů. Poznání imunitních mechanismů pomocí *in vivo* pokusů může přispět ke zvládnutí imunoprofylaxe případně imunoterapie mikrosporidíózy.

Zmíněná magisterská práce logicky navazuje a rozšiřuje výsledky úspěšně obhájené bakalářské práce Jiřího Jelínka, kdy byl sledován vliv interferonu gama a specifických protilátek v *in vitro* kulturách myších makrofágů.

Diplomová práce je tradičně rozdělena do hlavních kapitol úvod, cíle práce, materiál a metody, výsledky, diskuze, souhrn, seznam použitých zkratk a literatura, které obsahují celou řadu podkapitol. Celkový rozsah práce činí 46 stran.

Úvodní část diplomové práce je zpracována precizně a je věnována taxonomii mikrosporidií, jejich morfologii a životnímu cyklu, dále pak onemocněním působeným mikrosporidii, jejich diagnostice a léčbě. V následujícím oddílu autor podává ucelený a vyčerpávající přehled buněčných a humorálních složek imunitní odpovědi savčích hostitelů na infekci *Encephalitozoon cuniculi* a zaměřuje se na jejich význam v projektivní imunitě.

Cíle práce jsou jasně formulovány do tří dílčích bodů (první z nich dělen do dvou podbodů). První bod se zabývá posouzením významu IFN- γ produkovaného CD4+ T-lymfocyty a to pomocí adoptivních přenosů z naivních BALB/c nebo INF- γ knock-out myší do SCID myší a pomocí adoptivních přenosů CD4+ T-lymfocytů z naivních nebo imunizovaných BALB/c myší do SCID myší. Dalšími cíli jsou zhodnocení vlivu terapie myším rekombinantním IFN- γ a anti-*E. cuniculi* sérem u infikovaných SCID myší a zhodnocení vlivu imunizace antigenem *E. cuniculi* na průběh následné perorální infekce u IFN- γ KO myší.

Kapitola materiál a metody obsahuje obsáhlý soupis všech hlavních postupů a metod používaných během experimentů včetně detailních popisů jednotlivých provedených experimentů.

Výsledky jsou podrobně zpracovány, rozděleny do pěti podkapitol podle prováděných experimentů a dokumentovány sedmi grafy, které by přehledně shrnovaly slovy psané výsledky, nebýt nešťastně zvolené grafické úpravy u grafů 1,2,3,4 a 6, a to v černobílém provedení kombinace malých a velkých čtverců nebo koleček v jednom grafu.

V diskusi autor konfrontuje své výsledky vlivu IFN- γ a specifické polyklonální protilátky na průběh infekce *Encephalitozoon cuniculi in vivo* jak s domácí, tak zahraniční literaturou.

Souhrn je jasně a přehledně formulován a prakticky odpovídá stanoveným cílům práce.

K práci mám několik formálních připomínek týkajících se překlepů a pravopisných chyb, kterým se nikdo z nás nevyhne, ale posudek jimi nebudu zatěžovat a jsou uvedeny v soupisu níže.

(Anotace: reconstruction (reconstitution))

Obsah: 1.3. *Encephalitozoon (Encephalitozoon)*

1.3.1.4. cytotoxický T-lymfocytární odpověď (cytotoxická)

Úvod: 1.1.1. *Nosema bombicis (bombicis)*

1.1.4. *Branchioloa algerae (Branchioloa)*

1.3.1.1. samotný účinek CD+ T-lymfocytů (CD4+)

1.5. citace Bosma a Carroll 1983 – v soupisu literatury je uvedeno správně 1991

Materiál a metody: 3.3. *at libitum (ad libitum)*

3.6. software System 2 (System)

Výsledky: 4.1., 4.2. $p < 0,05$ ($P < 0,05$)

- 4.2. v tomto pokuse (pokusu)
4.5. myši imunizované antigenem *E. cuniculi* měli (měly)
- Diskuze:** Salát (2006) (Salát a spol. (2006))
E. cuniculi (*cuniculi*)
- Seznam použitých zkratk:** SwAM/Px – není uvedeno typ značení
- Literatura:** Beplazes P.A.,1996 (Deplazes)
pořadí citací Schoettelius J.2000, Sousa C.R.,1997, Schmidt E.C.,1984, Southern T.R.,2006a
chybí citace Hollister W.S., Canning E.U. 1987: An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of
antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* and its use in determination of infections in man. Parasitology 94: 209-219.)

Nicméně neodpustím si upozornit na nesprávný výklad výsledků práce Salát a spol. (2004) v kapitole 1.3.1.3. týkající se úlohy interleukinu 12, kdy je uvedeno: „Jeho přítomnost (IL-12) je nezbytná pro přežití jak i.p. tak p.o. infekce *E. cuniculi*. V tomto ohledu se imunitní odpověď na infekci *E. cuniculi* částečně liší od imunitní odpovědi na infekci způsobenou dalším zástupcem rodu *Encephalitozoon*, *E. intestinalis*, kde absence IL-12 má za následek letální průběh pouze při i.p. infekci“. Ale ze zmíněné publikace vyplývá, že IL-12 KO myši podléhají pouze i.p. infekci *E. cuniculi* a přežívají jak i.p. tak p.o. infekci *E. intestinalis* a p.o. infekci *E. cuniculi*.

K autorovi mám několik věcných dotazů:

1. V kapitole 3.6. Analýza jednotlivých buněčných subpopulací pomocí průtokové cytometrie je uvedeno, že „pro analýzu jednotlivých buněčných subpopulací bylo použito půl milionu splenocytů nebo 250×10^5 buněk z izolované populace CD4+ T-lymfocytů“. Zdá se nepravděpodobné, že bylo použito 25 milionů buněk po izolaci CD4+ T-lymfocytů pouze pro stanovení úspěšnosti izolace. **Kolik tedy bylo skutečně použito buněk?**
2. **Jaké bylo časové schéma při terapii anti-*E. cuniculi* sérem u SCID myši?**
V kapitole 3.15.4 to není uvedeno.
3. V pokusech s aplikací IFN- γ autor porovnává vliv komerčního a zde vyrobeného rekombinantního interferonu a vyvozuje z toho závěry. Nicméně oba zmíněné typy interferonu byly podávány v odlišném schématu a dávkách (6 dávek 3×10^3 U každý třetí den a 12 dávek $1,5 \times 10^4$ U každý druhý den). **Byl proveden experiment, kdy byly oba typy interferonu testovány za stejných podmínek?**

Závěr: Přes výše uvedené připomínky a výtky považuji předloženou diplomovou práci za zdařilou, splňující vytyčené cíle. Svědčí o schopnosti autora pracovat s vědeckou literaturou, plánovat, provádět i vyhodnocovat experimenty a ze získaných výsledků vyvozovat závěry. Výsledky magisterské práce Bc. Jiřího Jelínka doplňují a rozšiřují výsledky studií a experimentů prováděných v laboratořích Imunologie parazitóz a Lékařské a veterinární parazitologie zdejšího ústavu.

Předložená magisterská práce Bc. Jiřího Jelínka splňuje veškeré požadavky kladené na magisterské diplomové práce na Biologické fakultě Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích a **doporučuji ji k obhajobě** a navrhuji klasifikaci **v ý b o r n ě**.

V Českých Budějovicích, 15.5.2007

RNDr. Bohumil Sak, Ph.D.

