

Oponentský posudek na magisterskou práci Michaely Kotkové
**Průběh mikrosporidie způsobené *Encephalitozoon cuniculi* u imunokompetentních a
imunodeficientních myši**

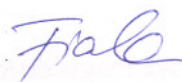
Michaela Kotková ve své magisterské práci zaznamenala průběh mikrosporidie u BALB/c a SCID myši. Sledovala průběh infekce po léčbě albendazolem. U BALB/c myši se také snažila vyvolat imunosupresy a poté sledovat šíření parazita do jednotlivých orgánů. Provedla také reinfekci BALB/c myši po léčbě albendazolem.

Navržené schéma experimentů je velmi promyšlené a snaží se získat komplexní informace o průběhu šíření mikrosporidie v orgánech laboratorních myši. Z práce vzešly zajímavé výsledky, které nebude problém publikovat v kvalitním časopise.

K práci mám jen několik připomínek a dotazů:

- 1) Na straně 7 se uvádí, že je-li makrofág infikován aktivně mikrosporidii ztácí své fagocytické schopnosti. Je známo proč makrofág tuto funkci ztácí?
- 2) Tabulka 1 je zmíněna v textu na straně 7, ale objevila se až na straně 10.
- 3) Na straně 10 je použit termín “Členové rodu *Encephalitozoon*” - běžnější je termín zástupci rodu.
- 4) Podle čeho bylo stanoveno množství dávky albendazolu a směsy imunosupresiv podávaného SCID a BALB/c myším?
- 5) Na straně 18 je zřejmě uvedená nesprávná hodnota otáček beadbeateru - 5,5 rpm.
- 6) U primerů by měl být uveden literární zdroj, nebo byly primery poprvé použity v této práci? Byly hodnoty pro amplifikaci stejné u primární a sekundární PCR? Pozn.: Ne úplně standardní je výrazně odlišná délka primerů, jak je tomu u sekundární PCR, z čehož plyne i odlišná teplota nasedání primerů. Navíc 15 bazový MSP1R primer má délku a složení odpovídající teplotě tání v rozmezí 46 až 50°C - v protokolu je uvedena nasedací teplota 58°C. Na druhou stranu důležité je, že PCR v praxi fungovala.
- 7) Není uvedeno, který gen a jak velký úsek DNA byl amplifikován za účelem identifikace přítomnosti mikrosporidii ve vzorku.
- 8) Metodika je celkově vypracována velmi podrobně - na některých místech až příliš, např. vyjmenování nicneříkajících zkratk pufrů obsažených v komerčním kitu pro izolaci DNA je úsměvné (str. 21). Když jsme u zkratk, nebylo by na škodu v práci zařadit oddíl seznam zkratk s jejich vysvětlením, např. co je chemikálie RPMI?
- 9) Výsledky v 8 tabulkách a třech grafem s podrobným komentářem v textu přehledně informují čtenáře o hlavních výsledcích práce. K výsledkům nemám žádné výhrady.
- 10) První strana diskuze je spíše opakováním úvodu, nicméně zbylá část splňuje svou podstatu a propojuje vlastní výsledky s publikovanými daty.

Uvedené připomínky k práci považuji za drobnosti, práce je vysoce kvalitní a vřele ji doporučuji k obhajobě. Magisterskou práci Michaely Kotkové hodnotím známkou výborně.



V Českých Budějovicích, 23. 5. 2011

RNDr. Ivan Fiala, PhD

Oponentský posudek na magisterskou diplomovou práci Bc. Michaely Kotkové na téma:

Průběh mikrosporidie způsobené *Encephalitozoon cuniculi* u imunokompetentních a imunodeficientních myší

Zvýšený zájem o studium mikrosporidií se objevuje současně se vzrůstajícím výskytem lidského onemocnění syndromem získané imunodeficiency. Do té doby byly mikrosporidie známy jen jako běžní paraziti zvířat a hmyzu, kteří se u lidí vyskytují spíše sporadicky. Avšak s érou onemocnění AIDS se postavení mikrosporidií zásadně změnilo. Tyto organismy jsou známy jako původci oportunních infekcí u imunodeficientních jedinců a zejména pak u pacientů trpících AIDS. Informace získané z přirozené i experimentální infekce laboratorních zvířat poskytují základ pro porozumění vztahu hostitel – parazit při mikrosporidiovém onemocnění člověka.

Diplomantka ve své magisterské práci srovnává průběh mikrosporidie u imunokompetentních a imunodeficientních myších hostitelů. K infekci si vybrala mikrosporidii *Encephalitozoon cuniculi*. Vzhledem k tomu, že se jedná o první savčí mikrosporidii, která byla úspěšně kultivována v *in vitro* kulturách, je tato mikrosporidie oblíbeným modelovým organismem při studiu mikrosporidiové infekce. Mnoho z toho, co je o patogenezi mikrosporidiové infekce známo, je založeno na experimentální infekci laboratorních zvířat právě druhem *Encephalitozoon cuniculi*.

Předložená práce rozsahu 55 stran je psána srozumitelným jazykem s minimem chyb a překlepů (str. 44 ř. 4 mikrosporidie, dále bych sjednotila označení pro infekci mikrosporidii na mikrosporidiovou či mikrosporidiální, rozhodně ne mikrosporidiovou jak je tomu na str. 1 ř. 19, formulace.....Existuje důkaz, že také existuje..... na str. 9 by se také jistě dala obejít lepším opisem, na str. 17 Směs imunopresiv.....byla podávána). Práce je klasicky členěna do jednotlivých kapitol. Chybí mi zde však seznam zkratk, které jsou ve většině případu v textu vysvětlené, ale není tomu tak u každé zkratky např. str. 16 PaÚ BC AVČR nebo na téže straně SCID myši.

Úvod je tvořen 14 stránkami, na kterých se čtenář seznamuje s tématem diplomové práce. Teoretický přehled poměrně podrobně zpracovává taxonomii, biologii včetně morfologie a životního cyklu mikrosporidií, samostatná kapitola je věnována v práci použitému druhu *E. cuniculi*. V části Zdroje lidské nákazy str. 7 je uvedena tabulka I, která

je však trochu nelogicky umístěna až na str. 10. Úvod je zakončen informacemi o použitých imunosupresivech.

Cíle práce jsou stanoveny jasně a jednoznačně.

Z kapitoly Materiál a metody je zřejmé, že autorka zvládla širokou škálu laboratorních technik od práce s laboratorními zvířaty, manipulace a kultivace mikrosporidií až po histologické metody a čistě molekulární metody izolace a detekce DNA.

Z výsledkové části této práce je patrné, že mikrosporidie *E. cuniculi* jsou schopné přežívat v orgánech imunokompetentního myšího hostitele v dostatečném množství, takže po imunosupresi hostitele jsou mikrosporidie schopny infikovat další orgány, což by při radikálním snížení imunity mohlo vést k rozvoji závažné mikrosporidie u takto imunodeficientního hostitele. Účinek použité léčby byl jen dočasný.

V diskuzi jsou kriticky zhodnoceny dosažené výsledky v konfrontaci s literaturou.

Měla bych na autorku několik dotazů:

- ✓ Zajímalo by mě, jakou jste použila metodu pro mikroskopický důkaz DNA (str. 25, Gramovo modifikované barvení (Obr. 1), které je zde uvedeno, to jistě nebylo).
- ✓ Myslíte si, že infekční dávka hraje zásadní roli při infekci jak imunokompetentního, tak imunodeficientního hostitele? A je pro mikrosporidie vůbec definována nějaká minimální infekční dávka?
- ✓ Ani na jednom z grafů ve výsledkové části jsem neobjevila základní statistické údaje. Proč?
- ✓ Jak byste označila účinek albendazolu? Jaký je poločas rozpadu léku a koreluje s vymizením účinku na mikrosporidie?
- ✓ Proč jste zvolila právě Vámi použitá imunosupresiva? Jaká jiná by byla vhodná po zkušenostech z tohoto experimentu?

Autorka sepsáním této práce dokázala, že je schopna samostatně pracovat s vědeckou literaturou, plánovat a provést experimenty a vyhodnotit získané výsledky. Předloženou magisterskou práci Bc. Michaely Kotkové považuji po stránce formální a obsahové za spis, který splňuje standardní požadavky kladené na diplomové práce na Přírodovědecké fakultě Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích. Práci doporučuji k obhajobě a po jejím úspěšném absolvování ji hodnotím stupněm výborným.

V Českých Budějovicích, 20.5.2011.

Pavlna Tinavská
RNDr. Pavlna Tinavská, PhD.