

Prof. RNDr. Václav Hypša, CSc.  
vedoucí Katedry parazitologie  
Přírodovědecká fakulta JU  
České Budějovice

Věc: Oponentský posudek na diplomovou práci Bc. Marie Jalovecké „Vývoj protektivní imunitní odpovědi v žaludečním epitelu myši infikovaných *Cryptosporidium muris* a *Cryptosporidium andersoni*“

---

Předložená diplomová práce Marie Jalovecké byla vypracována pod vedením doc. Ing. Martina Kváče, Ph.D. jako školitele a dále pod dohledem školitelů specialistů RNDr. Bohumila Saka, Ph.D. a RNDr. Jiřího Saláta, PhD. Diplomová práce má standardní členění požadované pro diplomové práce vzniklé na PŘF JU v Českých Budějovicích. Po Úvodu v rozsahu 20 stran, který je literárním přehledem zaměřeným na biologii kryptosporidií s důrazem na žaludeční kryptosporidie a na imunitní odpověď hostitelů při kryptosporidiových infekcích, následují části Cíl práce (1strana) a rozsáhlá kapitola věnovaná popisu použitých metod (26 stran), část Výsledky (25 stran), část Diskuze (9 stran) a kapitola Závěr (2 strany a 2 řádky). Po Seznamu použitých zkratk (2 strany) následuje přehled literatury je uveden na 17 stranách (cca 180 citací).

Problematika řešená v rámci diplomové práce je velmi aktuální a navazuje na dosavadní poznatky o imunologii kryptosporidiových infekcí. Aktuálnost tématu je podpořena faktem, že specifická imunitní odpověď je doposud jediným známým efektivním mechanismem vedoucím k vyléčení hostitele z kryptosporidiózy, protože dosud nebyla popsána žádná jednoznačně účinná chemoterapie.

Na předložené diplomové práci oceňuji komplexní metodický přístup k imunologické problematice žaludeční kryptosporidiózy. Za nejzajímavější považuji analýzu subpopulací leukocytů v místě infekce, tj. přímo v žaludeční sliznici, využití vícebarevné průtokové cytometrie (FACC) a sledování změn genové exprese IFN- $\gamma$  v žaludcích experimentálních zvířat pomocí real-time PCR. Tyto metodické přístupy jsou při studiu imunologie žaludeční a částečně i střevní kryptosporidiózy nové a jejich aplikace přináší prioritní výsledky.


Z výsledků získaných za použití nejenom výše zmíněných metod považuji za významné informace o absenci cytotoxické úlohy CD8<sup>+</sup> T-lymfocytů přes systém perforin-granzymy vedoucí k imunitní kontrole kryptosporidiózy, která byla vyloučena experimenty na imunodeficientních C57BL/6 Pfr1<sup>-/-</sup> myších. Je zřejmé, že buňky napadané kryptosporidii jsou zabíjeny alternativním způsobem než buňky infikované např. mikrosporidii, tj. jinými oportunními parazity, kterým je na pracovištích Parazitologického ústavu BC AV ČR, v.v.i. také věnována pozornost. Dalším prioritním výsledkem, který mne zaujal, je zjištěná skutečnost, že experimentální infekcí BALB/c myši druhem *C. andersoni* byla navozena rezistence k následné infekci jiným druhem *C. muris*.

Po pečlivém přečtení uvítám odpovědi/komentáře autorky diplomové práce na níže uvedené dotazy/komentáře:

- mám výhrady k formulaci na str. 25 („infikované myši byly usmrceny zlomením vazů“)
- v části Cíl práce jste formulovala celkem 10 dílčích bodů; některé z nich jsou ryze metodického charakteru (např. „Zvládnout metodu multibarevného značení leukocytů pomocí průtokové cytometrie“). Podle mého názoru tyto dílčí metodické úkoly (zvládnutí metody) nemohou být cílem diplomové práce
- řada použitých metod je značně náročná na standardní provedení; a proto uvítám stručnou specifikaci Vašeho aktivního na jednotlivých metodách; předpokládám pomoc kolegů, kteří se těmito metodami zabývají již delší dobu
- oceňuji kvalitní a srozumitelně formulovanou diskuzi
- postrádám stručně formulovanou anotaci/abstrakt v češtině, ve které by byly shrnuty jednotlivé body (celkem 23 bodů) z kapitoly Závěry
- jaký je Váš názor na využití poznatků o zkřížené navozené rezistenci u žaludečních kryptosporidií (*C. andersoni* - *C. muris*) při infekcích střevními kryptosporidii?
- seznam literatury zahrnuje velký počet citací; stihla jste opravdu všechny práce detailně prostudovat?

Podle Studijního a zkušební řádu PŘF JU je diplomová práce publikovatelným vědeckým sdělením. V případě předložené diplomové práce jsou získané výsledky podkladem pro více imunologicky zaměřených publikací. Autorka diplomové práce již prokázala schopnost shrnout výsledky předchozí bakalářské práce ve formě publikace (Jalovecká M., Sak B., Kváč M., Květoňová D., Kučerová Z., Salát J. 2010. Activation of protective cell-mediated immune response in gastric mucosa during *Cryptosporidium muris* infection and re-infection in immunocompetent mice. Parasitol. Res. 106: 1159–1166.). Proto předpokládám, že výsledky diplomové práce budou v brzké době publikovány. Považuji předloženou diplomovou práci za přesvědčivý doklad schopnosti studentky zpracovat zadané téma (za významného využití zkušeností a podpory školitele, školitelů specialistů a dalších spolupracujících kolegů) a získat prioritní výsledky. Doporučuji proto diplomovou práci k obhajobě a hodnotím jí klasifikačním stupněm 1 (A).

V Brně dne 16. ledna 2012

  
Prof. MVDr. Břetislav Koudela, CSc.  
Veterinární a farmaceutická univerzita Brno  
Palackého 1-3  
612 42 Brno  
e-mail: [koudelab@vfu.cz](mailto:koudelab@vfu.cz)  
telefon: 541 562 262  
fax: 541 562 266  
mobil: 724 272 922

## **Posudek na magisterskou diplomovou práci Bc. Marie Jalovecké „Vývoj protektivní imunitní odpovědi v žaludečním epitelu myši infikovaných *Cryptosporidium muris* a *Cryptosporidium andersoni*“**

I když kryptosporidie nepředstavují vysoce nebezpečné původce lidských parazitóz srovnatelné s malárií, leishmaniózou nebo schistosomózou, jde o významné původce oportunních parazitóz s epidemickým potenciálem. Infekce kryptosporidiiem nabývá na významu zejména u imunodeficientních jedinců (AIDS). Z hlediska možné léčby kryptosporidie a zejména vakcinace je třeba znát imunitní odpověď proti této infekci a zejména identifikovat mechanismy protektivní imunity. Vzhledem k podceňovanému významu kryptosporidie v minulosti se o imunitě proti střevním a zejména žaludečním kryptosporidiiím ví málo.

Maruška Jalovecká navázala na dlouhodobý výzkum kryptosporidii v Laboratoři veterinární a medicínské protistologie a snad i imunologické studie mikrosporidii prováděné na tomto pracovišti. K výzkumu si vybrala dva druhy žaludečních kryptosporidii, *Cryptosporidium muris* a *C. andersoni*. K objasnění úlohy lymfocytárních subpopulací využila „knock-outů“ a své výsledky založila zejména na analýze infiltrace subpopulací imunokompetentních buněk do žaludečního epitelu.

Práce obsahuje dvacetistránkový úvod, ve kterém se autorka zabývá taxonomií, vývojovými cykly, klinikou a epidemiologií kryptosporidii, konkrétněji popisuje oba studované druhy. Větší část úvodu je věnována imunitní odpovědi na kryptosporidiovou infekci, kde autorka probírá poznatky o úloze jednotlivých typů imunity i vybraných lymfocytárních subpopulací. Úvod je psán přehledně, srozumitelně pěkným vědeckým jazykem jako ostatně celá diplomová práce.

Cílů si studentka klade 10, dva z nich jsou metodické. Cíle jsou jasně formulovány a logicky na sebe navazují.

Kapitola Materiál a metodika je psána velmi podrobně a zahrnuje jak metody parazitologické, tak zejména imunologické. Kromě klasického parazitologického vyšetření trusu na přítomnost oocyst je zahrnuto i molekulární vyšetření založené na nested PCR. Imunologická vyšetření zahrnují izolaci intraepiteliálních lymfocytů, průtokovou cytometrii, ELISA testy i genovou expresi cytokinů pomocí real-time PCR.

Výsledky jsou založeny na porovnání průběhu kryptosporidiové infekce u imunokompetentních a imunodeficientních myší, kterým chyběla jedna ze subpopulací T lymfocytů nebo perforin. Na význam jednotlivých subpopulací lymfocytů a dalších imunologicky aktivních buněk Maruška usuzovala ze změn jejich zastoupení v žaludečním epitelu v průběhu infekce. Autorka získala značné množství dílčích výsledků, které poskytují obraz o imunitní odpovědi na kryptosporidiovou infekci. Potvrdila literární údaje o významu T lymfocytů v obraně proti této infekci a naznačila zapojení jak CD4+ tak CD8+ T buněk. I když defekt v pomocných T lymfocytech se projevil největším prodloužením patentní periody, i cytotoxické T lymfocyty měly svou obrannou úlohu. Tyto buňky se však neuplatňovaly svým cytotoxickým mechanismem, ale podobně jako CD4+ lymfocyty

produkcí prozánětlivých cytokinů, zejména IFN- $\gamma$ . Skutečnost, že i CD4+ T deficientní myši se „samovyléčily“ z infekce naznačuje, že funkce těchto buněk může být zastoupena jinými (CD8+ T lymfocyty). Nárůst počtu  $\gamma\delta$  T lymfocytů v místě infekce hovoří i pro jejich možnou roli v obraně proti kryptosporidiióze. Maruška také prokázala po prodělané kryptosporidiové infekci imunologickou paměť, která fungovala i mezi *C. andersoni* a *C. muris* zřejmě díky zkřížené imunologické reaktivitě.

Je samozřejmě otázkou, zda zvýšení počtu určité buněčné subpopulace v místě infekce dokládá její úlohu v obraně proti této infekci, ale tento přístup je běžný v imunoparazitologickém výzkumu. Definitivní odpověď pak mohou přinést adoptivní přenosy imunity nebo použití knock-outů. V této souvislosti mne napadá, že tvrzení o významu IFN- $\gamma$  by bylo dobré podpořit použitím IFN- $\gamma$  knock-outů, které dříve byly na PaU dostupné.

Kapitola Diskuse obsahuje 10 stran zasvěcené diskuse vlastních výsledků i jejich konfrontace se světovou literaturou. Diskuse je přehledná, jednotlivé imunitní mechanismy jsou probírány postupně. Podle mého názoru je diskuse téměř vyčerpávající (dané téma, nikoli čtenáře).

Následuje přehledný závěr, kde jsou v bodech shrnuty dosažené výsledky. Protože výsledků je relativně mnoho, považuji toto shrnutí za velmi užitečné.

Literatura obsahuje úctyhodných 192 citací včetně práce z roku 2010, jejíž je Maruška Jalovecká první autorkou.

Diplomová práce mi na jedné straně udělala jako oponentovi velkou radost svou všestrannou kvalitou, na druhé straně mně „otrávila“ tím, že jí nebylo téměř co vytknout. Snad v kapitole materiál by specifikace imunodeficientních myší mohla být podrobnější (viz www stránky The Jackson Laboratory). U použitých izolátů kryptosporidií by měl být také odkaz na původní práci, která izolát popisuje, pokud to jde.

Dotazy:

1. Pokud připustíme, že obranná úloha CD4+ a CD8+ T lymfocytů se realizuje přes produkci IFN- $\gamma$ , jak si autorka představuje mechanismus obranného působení interferonu?
2. Jaká je (pokud vůbec) úloha protilátek v protektivní imunitě proti kryptosporidiím? Souviselo by to s vývojem vakcín založených na rekombinantních antigenech kryptosporidií.

Závěr: Marie Jalovecká předložila vynikající práci, která může být podkladem minimálně jedné publikace v kvalitním impaktovaném časopise. Práci doporučuji k obhajobě a hodnotím jako výbornou (s pochvalou).

V Českých Budějovicích 16. 1. 2012

Doc. RNDr. Jan Kopecký, CSc.