

Oponentský posudek na magisterskou diplomovou práci Bc. Kláry Brdíčkové na téma:

Role zánětu v aktivaci latentní mikrosporidiózy způsobené *Encephalitozoon cuniculi* u imunokompetentních a imunodeficientních myší

Zvýšený zájem o studium mikrosporidií jakožto ubikvitárních mikroorganismů má bezpochyby souvislost s nárůstem výskytu lidského onemocnění syndromem získané imunodeficience (AIDS), kdy se oportunní mikrosporidiové infekce s průjmy a systémovým onemocněním pacientů s AIDS dostaly do zorného pole nejen vědy, ale především lidské medicíny.

Vzhledem k tomu, že průběh a závažnost tohoto onemocnění závisí kromě druhu a genotypu parazita zejména na stavu imunitního systému hostitele je zřejmé, že rozvoj léčebných technik, které jsou zaměřené právě na modulaci imunitního systému a to zejména ve smyslu potlačení jeho aktivity např. u pacientů při transplantaci, při léčbě některých autoimunitních onemocnění (nespecifické střevní záněty, roztroušená skleróza) nebo nejen při biologické léčbě maligních onemocnění (leukémie, lymfomy), s sebou přináší riziko ohrožení ne nepodstatně velké skupiny sekundárně imunodeficientních pacientů tímto patogenem.

Informace získané z přirozené i experimentální infekce laboratorních zvířat poskytují základ pro porozumění vztahu hostitel – parazit při mikrosporidiovém onemocnění člověka.

Diplomantka si pro experimentální část své magisterské práce vybrala druh *Encephalitozoon cuniculi*, první savčí mikrosporidii, která byla úspěšně kultivována v *in vitro* kulturách a je tedy oblíbeným modelovým organismem při studiu mikrosporidiové infekce. Studium a poznání patogeneze mikrosporidiové infekce jsou založeny zejména na experimentální infekci laboratorních zvířat právě tímto druhem.

Předložená práce rozsahu 60 stran je psána srozumitelným jazykem s minimem chyb a překlepů či neobratných vyjádření (str. 16 ř. 22 byla popsána infekce-schopnost u spor..., str. 19 ř. 8 stimulací protilátek produkujících plazmatických buněk). K citaci na str. 46 Sak et al. 2011b jsem nenašla odkaz v citované literatuře.

Práce je klasicky členěna do jednotlivých kapitol.

Úvod je tvořen 3 stránkami, na kterých se čtenář seznamuje s tématem diplomové práce. Poměrně rozsáhlý literární přehled podrobně zpracovává taxonomii, biologii včetně morfologie a životního cyklu mikrosporidií, popisuje průběh mikrosporidie a klinické příznaky tohoto onemocnění. Samostatná kapitola je věnována v práci použitému druhu *E. cuniculi*. Vzhledem k tomu, že ústředním tématem této práce je zánět a jeho role v aktivaci latentní mikrosporidie, čekala bych od diplomantky, že bude věnovat více pozornosti tomuto základnímu obrannému mechanismu. Co je to vlastně zánět, jaké buňky a mediátory nejen imunitního systému se ho účastní?

Cíle práce jsou stanoveny jasně a jednoznačně.

Z kapitoly Materiál a metodika 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 indukce zánětu v tomto případě nekompletním Freundovo adjuvans má do jisté míry vliv na šíření mikrosporidie *E. cuniculi* z místa původní akutní infekce do místa se zánětem v porovnání s kontrolní skupinou jak u imunokompetentních tak i imunodeficientních myších modelů. Výsledky imunokompetentních BALB/c myší s chronickou infekcí pak naznačují, že přestože zánět nemá vliv na migraci spor do ložiska zánětu, může aktivovat latentní mikrosporidie u těchto hostitelů. U imunokompetentních zvířat nebyla prokázána symptomatická infekce.

V diskuzi jsou kriticky zhodnoceny dosažené výsledky v konfrontaci s literaturou. Trochu v rozporu s výsledky na str. 39, kde autorka píše: U SCID myší byly na rozdíl od ostatních použitých skupin myší pozorovány klinické příznaky mikrosporidie zahrnující naježenou srst, nahrbený hřbet a kachexie, zejména na konci sledovaného období. Toto pak v diskuzi na str. 44 autorka popírá slovy ... nebyly u žádné z imunodeficientních SCID myší zaznamenány klinické příznaky mikrosporidie až do 28 DPI, kdy byly myši usmrceny. Možná z důvodu absence průmů?

Vlastní práce je pak ukončena jasně definovanými závěry, které mají oporu ve výsledcích předložené studie.

Měla bych na autorku několik dotazů:

- ✓ Proč jste pro indukci zánětu použila nekompletní Freundovo adjuvans?
- ✓ Jaký rozdíl je mezi makrofágy a monocyty? A které jiné profesionální fagocyty mohou hrát zásadní úlohu v diseminaci, resp. migraci mikrosporidií nejen u myší s defektním migračním faktorem makrofágů do místa zánětu a proč?
- ✓ Myslíte si, že infekční dávka hraje zásadní roli při infekci jak imunokompetentního,

tak imunodeficientního hostitele? A je pro mikrosporidíózu vůbec definována nějaká minimální infekční dávka?

- ✓ Zkusila byste na základě svých výsledků a dostupných informací z literatury navrhnout schéma vlivu zánětu, resp. mechanismů imunitního systému, které se na zánětu podílí a mohly by mít vliv na šíření mikrosporidií v zánětem modulovaném organismu?

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. Kláry Brdíčkové 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, 14.5.2019.



RNDr. Pavlína Tinavská, PhD.

Oponentský posudek na diplomovou práci Kláry Brdíčkové „Role zánětu v aktivaci latentní mikrosporidie způsobené *Encephalitozoon cuniculi* u imunokompetentních a imunodeficientních myší“

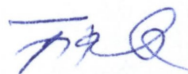
Ve své magisterské práci se Klára Brdíčková věnovala průběhu infekce *Encephalitozoon cuniculi* do ložiska zánětu u imunokompetentních a imunodeficientních myší a všimla si role makrofágů v migraci *E. cuniculi* do ložiska zánětu.

Práce je po formální stránce v pořádku. Je psána velmi dobrou češtinou. Úvod a literární přehled je sepsán přehledně a výstižně, čtenář je dobře uveden do dané problematiky. Možná jen kapitola 2.9 „Freundovo adjuvans“ mohla být uvedena jednou větou, která by vysvětlila, proč je tato látka v předložené práci zmiňována. Cíle jsou výstižné a jasné. Metodika správně popisuje postupy k dosažení daných cílů. V kapitole 4.10 a 4.11 je velmi podrobně popsán postup izolace DNA pomocí komerčních kitů – v magisterské práci by stačilo jen odkázat na postup uvedený v manuálu ke kitu, případně stručně popsat metodu izolace pomocí kitu. V kapitole 4.12 je pravděpodobně uvedena špatná teplota pro extenzi polymerázy a to 60 °C – předpokládám, že by měla být 72 °C. Dále v tabulce 2 jsou nepřesné údaje o objemech přidávaných reagensů: celkový objem je udán 20 µl, přičemž objemy primerů, DNA a vody již dávají dohromady tento výsledný objem a na Taq polymerázu, dNTPs a pufr již nezbyvá žádný objem. Výsledky jsou podle mého názoru velmi dobře sepsány, hlavně jejich obrazová příloha je velmi přehledná a dává jasný přehled o výskytu a průběhu infekce mikrosporidií. Pouze obrázky histologických řezů jsou zbytečně malé, prostor na větší formát v magisterské práci by určitě byl. Diskuze je velmi zajímavá, obzvláště souvislost s pravděpodobnou rolí mikrosporidií jako příčinou degradace kostní tkáně u pacientů s endoprotézou kyčelního kloubu. A zejména to, že předložená práce potvrdila domněnku o cílené migraci mikrosporidií do místa zánětu.

K práci mám následující konkrétní otázky:

- 1) Na straně 10 je údaj, že mikrosporidií je popsáno téměř 1500 druhů a na straně 13, že je popsáno téměř 1300 druhů. Údaj o nižším počtu druhů má dokonce novější citaci než vyšší číslo počtu druhů. Lze odhadnout jaký je v současné době přibližný počet popsaných druhů? Ale spíš by mě zajímalo, jestli se někdo zabýval odhady skutečného počtu druhů mikrosporidií na naší planetě (nebo jaký je váš soukromý odhad).
- 2) Proč byly pro detekci mikrosporidií vybrány zrovna játra a ne jiný orgán(y)?
- 3) Velmi zajímavý výsledek a pro medicínu určitě velmi významný je to, že se podařilo prokázat, že mikrosporidie cíleně migrují do místa zánětu. Lze předpokládat podobnou vlastnost i u jiných mikrosporidií než je studovaný druh *E. cuniculi*?
- 4) Takto významný výsledek si zaslouží publikaci – chystáte zveřejnění těchto výsledků? V jakém časopise?

Předloženou diplomovou práci Kláry Brdíčkové vřele doporučuji k obhajobě,



V Českých Budějovicích, 20. 5. 2019

RNDr. Ivan Fiala, Ph.D