

# Oponentský posudek na diplomovou práci PŘF UK

Název práce: **The skin immune response of mice infected with avian schistosomes**  
(Imunitná odpověď v kůži myši infikovaných vtáčimi schistosomami)

Autorka: **Bc. Alena Revalová**  
Pracoviště: Přírodovědecká fakulta UK  
Vedoucí práce: RNDr. Tomáš Macháček, Ph.D.  
Konzultant: Mgr. Martin Majer

Předložená práce se zabývá problematikou vzniku a průběhu cercáriové dermatitidy s cílem objasnit za různých podmínek patogenní potenciál larválních stádií ptačích schistosom druhů *Trichobilharzia regenti* a *T. szidati*.

Odborná práce čítá 98 stran psaného textu, členěného do standardních kapitol: Úvod a cíl práce, Literární přehled, Materiál a metody, Výsledky, Diskuse, Shrnutí, Závěr, Seznam literatury a navíc Dodatek - příloha s obrázky. Společně s dodatkem je text je doplněn celkem 39 obrázky a 36 tabulkami. Text je navíc doplněn o seznam hojně používaných zkratk.

**Úvod a cíle práce a Literární přehled** se zabývají etiologií cercáriové dermatitidy, kožního infekčního onemocnění vyvolaném v přírodních vodách larválními stádii (cercáriemi) motolic čeledi Schistomatidae. Zvláštní zřetel je věnován zástupcům ptačích schistosom rodu *Trichobilharzia*, které jsou považovány za nejvýznamnější původce cercáriové dermatitidy u lidí. Shrnuje doposud známé poznatky o biologii původců dermatitidy, epidemiologii onemocnění, příčinách vzniku, průběhu a projevech infekce definitivního a abnormálního hostitele. Na jedné straně jsou tedy předloženy informace o životním cyklu různých druhů schistosom, včetně mechanismů umožňujících vyhledání a průnik cercárií do kůže obratlovce. Na straně druhé jsou shrnuty znalosti o faktorech, umožňujících vývoj a migraci parazitů nebo jejich zničení imunitním systémem hostitele. Znamé mechanismy umožňující přežívání či úhyn parazitů následkem obranných reakcí hostitele jsou objasněny jak na úrovni lokální, tak systémové imunitní odpovědi. Jak z textu vyplývá, přes doposud neúplné informace se zdá, že cercárie různých druhů schistosom a jmenovitě trichobilharzií se od sebe budou odlišovat, mimo jiné, různou mírou patogenního potenciálu pro vznik cercáriové dermatitidy. Míra odlišnosti v tomto potenciálu se u jednotlivých druhů schistosom doposud nedá exaktně stanovit. Hlavním problémem dosavadních studií, jak autorka uvádí, je skutečnost, že získané výsledky byly získávány různými metodickými postupy a nejsou tudíž srovnatelné. Navíc se většinou jedná o kusé informace získané studiem odlišných druhů schistosom, přičemž u řady z nich lze pochybovat i o správném taxonomickém zařazení. Proto bylo cílem autorky, aby na základě definovaných podmínek na experimentálním modelu – laboratorně získaných cercárií definovaných druhů schistosom a laboratorních myši – sledovala faktory odpovědné za vznik a průběh lokální, ale i systémové imunitní odpovědi. Objektem jejího studia byly cercárie dvou druhů validně popsanych trichobilharzií, které se odlišují svými biologickými vlastnostmi – neurotropní *Trichobilharzia regenti* a hemotropní *T. szidati*, jejichž životní cyklus byl uskutečňován v laboratorních podmínkách. V přehledu autorka předkládá podrobný přehled o aktuální situaci ve výzkumu nejen těchto druhů, ale vybrané informace dává do souvislosti i s výsledky zjištěnými studiem jiných parazitů, i těch taxonomicky vzdálených.

Následující kapitola „**Materiál a metodika**“ přehledně uvádí jednotlivé kroky, které mají vést k získání relevantních údajů o významu *T. regenti* a *T. szidati*. Přehled použitých metod je úctyhodný a svědčí o zvládnutí širokého spektra naprosto rozdílných přístupů. Od popisu získávání infekčního materiálu – cercárií, stanovování infekční dávky, přesné určení počtu cercárií proniklých do kůže, způsoby infekce laboratorních zvířat (perkutánní infekce ušních boltců). Izolace a zpracování sledovaného materiálu zahrnuje metody umožňující charakterizaci

i) lokální imunitní odpovědi - zahrnuto makroskopické pozorování patologických změn, mikroskopie zaměřená na histopatologické vyšetření tkání a imunofenotypizace buněk – leukocytů z kůže myších boltců průtokovou cytometrií;

a ii) systémové imunitní odpovědi sledováním specifické IgM a IgG odpovědi proti antigenům v homogenátu cercárií *T. regenti* a *T. szidati* metodami ELISA a hladin cytokinů (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-17 a IFN- $\gamma$ ), provedena byla i imunofenotypizace buněk lymfatických uzlin - příušních žláz průtokovou cytometrií.

Veškeré výsledky byly statisticky zpracovány.

Předností celé kapitoly je podrobné popsání všech kroků. Oceňuji, že složení použitých chemikálií a roztoků je uvedeno do tabulek.

V kapitole **Výsledky** jsou předloženy nové poznatky o trichobilharziích, které potvrzují, že i v rámci jednoho rodu se mohou jednotlivé druhy lišit svým imunopatogenním potenciálem. To je doloženo studiem tří skupin myši odlišně infikovaných cercáriemi buď neurotropní *T. regenti* nebo hemotropní *T. szidati* – i) jednorázově či ii) opakovaně 100 larvami, a iii) jednorázovaně 1 000 parazity. Svým výzkumem, který autorka prováděla za podmínek *in vivo* a *in vitro*, prokazuje u *T. regenti* vyšší potenciál k rozvoji lokálních i systémových imunopatologických změn v nespecifickém hostiteli. Na rozdíl od dosavadních předpokladů, že cercáriová dermatitida se projevuje zejména u osob sensibilizovaných předchozími infekcemi, autorka tedy nově dokládá, že cercáriová dermatitida se může v daném čase manifestovat alergickou vyrážkou bez ohledu na předchozí sensibilizaci jedince, přičemž míra imunopatologických změn může být ovlivněna druhem infekčního agens. Výzkumem rovněž zjistila, že expozice vyššímu počtu cercárií zvyšuje míru úspěšnosti parazitů proniknout do kůže hostitele a je možné, že *T. regenti* a *T. szidati* se vyznačují odlišnou mírou schopnosti proniknout do kůže obratlovce.

Předložené výsledky autorka dokladuje několika navazujícími studii. Ty ukázaly, že zatímco silná infekce 1 000 cercárií vedla k intenzivní imunitní odpovědi v kůži myši, po jednorázové aplikaci desetkrát nižší dávkou tento stav zaznamenán nebyl. Na rozdíl od slabých infekcí, byť opakovaných, se navíc jednorázové infekce vysokým počtem cercárií obou druhů makroskopicky projeví rychlým, ale přechodným rozšířením cév v místě infekce, přičemž výraznější reakci vyvolávala *T. regenti*. Histologie rovněž potvrdila, že k závažnějším patologickým změnám, charakterizovaným vedle již zmíněné vazodilatace i ztluštěním kůže, buněčným influxem a dokonce i tvorbou epidermálních abscesů, docházelo při infekci vysokým počtem cercárií. U infekcí vyvolaných *T. regenti* průtoková cytometrie prokázala rychlý příliv myeloidních buněk již od 1. dne p.i. (neutrofilů, monocytů), od 7. dne pak eozinofily; profesionální antigen prezentující buňky byly zastoupeny v menší míře, nicméně v pozdějších fázích infekce byly identifikovány ve zralém stavu. Přestože autorka nenašla výrazné rozdíly mezi histopatologickým obrazem kůže infikované *T. szidati* a *T. regenti*, její výsledky naznačují, že by *T. szidati* mohla migrovat rychleji než *T. regenti*.

U zvířat jednorázově vystavených silné infekci *T. regenti* autorka rovněž zaznamenala v kožní tkáni *in vitro* nejvýraznější zvýšení lokální produkce jak prozánětlivých, tak regulačních cytokinů. V porovnání s tímto stavem byla u zvířat reinfikovaných nízkou dávkou cercárií produkce prozánětlivých cytokinů, včetně alarminu TSLP, slabší. Studium *T. szidati*

opět prokázalo, že infekce vedou k mnohem slabší imunitní reakci organismu, než u předešlého druhu. Analýza průtokovou cytometrií potvrdila, že jednorázové silné infekce vysokým počtem cercárií vedou k mnohem silnější buněčné imunitní odpovědi než v případě jednorázové slabé infekce a jsou dokonce výraznější i v případě, pokud docházelo ke slabým infekcím zvířat opakovaně.

Vzhledem k tomu, že cercárie byly aplikovány na kůži ušních boltců, autorka rovněž sledovala změny ve spádových příušních lymfatických uzlinách a kromě jejich velikosti vyhodnocovala i počet přítomných leukocytů. K nejmarkantnějším změnám opět docházelo po jednorázové infekci vysokým počtem cercárií *T. regenti*, které se projevilo zvětšením uzlin (7. den p.i.) a proliferací leukocytů (již od 1. dne p.i.), přičemž k výrazný nárůst počtu buněk, s převahou B-lymfocytů, byl zjištěn od 7. dne p.i. V porovnání s touto skupinou, u reinfikovaných myší zaznamenala mírně zvětšené uzliny již od 2. dne p.i.; proliferace buněk s převahou B-lymfocytů byla pomalejší, ale stabilnější. Populace T-lymfocytů narůstala jen mírně a to bez ohledu na způsob infekce.

Vyšetřením sér zvířat ELISA metodou autorka prokázala, že s výjimkou zvířat jednorázově infikovaných nízkou dávkou cercárií, silné jednorázové infekce vedly k produkci specifických IgM protilátek; IgG detekovala pouze u zvířat opakovaně infikovaných *T. regenti*. Produkce cytokinů (IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-5, IL-10, IL-6 a TNF) byla nejvýraznější v sérech myší infikovaných *T. regenti*, zejména těch opakovaně reinfikovaných. V porovnání s předchozím druhem byla systémová odpověď u *T. szidati* časově opožděna a navíc byla zaznamenána pouze u zvířat jednorázově vystavených infekci vysokým počtem cercárií.

Veškeré výsledky autorka dokumentovala i velmi kvalitními obrázky fotografiemi a přehlednými tabulkami.

**Diskuse.** Autorka erudovaně porovnává získané výsledky se známými literárními údaji a to nejen v oblasti taxonomicky příbuzných parazitů, ale v případě objasnění mechanismů imunitní odpovědi i s těmi, které byly získány studiem jiných, taxonomicky vzdálených (např. *Ancylostoma duodenale*, *Toxocara canis*, aj.). Diskuze pro ni byla obtížná, neboť informací, které se týkají její výzkumné oblasti nejsou dostupné v dostatečném množství. V řadě oblastí, je tedy její výzkum vlastně průkopnický.

Přes kvalitní diskuzi o patogenním potenciálu ptačích schistosom bych ještě připojila úvahy o možném vlivu odlišného tropismu *T. regenti* a *T. szidati* k různým tkáním, což by mohlo mnohé objasnit.

Je potěšitelné, že autorka věnuje pozornost normální bakteriální flóře, která je běžně přítomná na kůži zvířat, a může ovlivnit následující patologický proces v kůži. Dle mého názoru by bylo také asi vhodné věnovat pozornost i samotným cercáriím, které se nevyklučují do sterilního prostředí, a ani v laboratorních podmínkách není zaručena stabilní mikrobiota ve vodě, do níž se vylučují z plžů. Povrch cercárií může být v roznych časech kolonizován různými bakteriemi, kvasinkami, aj.

V každém případě tato kapitola je sepsána přehledně a srozumitelně a přináší kvalitní posouzení získaných výsledků. Je třeba ocenit, že samotné diskuzi přikládá i analýzu kritických momentů studie, které by získané výsledky mohly ovlivnit.

**Závěr** stručně a přehledně shrnuje získané výsledky, **Seznam literatury** uvádí 117 zdrojových citací, které byly použity v diplomové práci.

### **Připomínky:**

K autorce článku několik připomínek. Po formální stránce je zřejmé, že práci byla věnována náležitá pozornost, obrazová dokumentace je velmi kvalitní, tabulky jsou přehledné. Nicméně jsem v textu zaznamenala, že v Obsahu např. není uvedeno, že po „Seznamu literatury“ bude

následovat „Dodatek“ s dalšími obrázky, což poněkud mate, zvláště pak, když v SIS je vložen samostatně.

- Text je sice přehledný, ale někdy dochází ke zbytečnému opakování informací, např. v kap. 4.2 - 2. a 3. věta vyjadřují totéž.
- V textu se objevují drobné chyby, např. str. 2,4 a dále - za citacemi uvedena dvojitá závorka, případně jsou dvě citace uvedeny v samostatných závorkách vedle sebe;
- u názvů rodů je nejednotně uvedeno „sp. nebo spp.“;
- u tabulek č. 25-36 se na konci textu popisu 2x opakuje stejný text;
- str. 8, 2. odst. – domnívám se, že byla myšlena imunitní odpověď systémová a nikoliv systematická;
- u příložených obrázků např. 10 A,B nebo 10 C,D by bylo vhodné buď předložit obrázky ve stejném zvětšení a toto uvést v popisu nebo označit vložená měřítko numerickým údajem o jejich velikosti, případně uvést tuto hodnotu do textu obrázku.

Odborná práce dokládá použití nezvykle velkého počtu metodických přístupů a díky tomu i množství výsledků. Možná by stálo za úvahu, aby za výsledky z jednotlivých oblastí bezprostředně následovala diskuze, což by usnadnilo čtenáři usnadnilo orientaci v textu.

Uvedené výtky rozhodně nesnižují kvalitu předloženého textu.

#### **Dotazy oponentky:**

- V kap. 2.1.1 autorka uvádí: „*Dospělci se nacházejí nejprve v žilách tenkého střeva a později ve střevní sliznici, kde kladou vajíčka. Vajíčka s miracidii jsou předávána ve výkalech infikovaného ptáka....*“ Zajímá mě, jaká je úloha střeva tlustého?
- Kap. 2.2.3 – Dalo by se na základě informace: „*Zatímco průnik *S. douthitti* vedl ke vzniku viditelných kožních lézí a destrukci cerkárií v epidermis i dermis myši, průnik *Gigantobilharzia huronensis* do dermis byl mnohem rychlejší, a proto byla v epidermis zničena pouze menšina schistosomul a nevznikly žádné papuly (Batten, 1956).*“ předpokládat, že by *G. huronensis* mohla vykazovat větší tendenci k následné migraci z kůže hostitele?
- Zvažujete ve svých pokusech možnost kultivace infekčního materiálu na přítomnost mikrobiálních agens?

**Hodnocení:** Předložená práce je pečlivě sepsána v anglickém jazyce, forma působí uceleně a z textu je zřejmý přehled autorky o dané problematice. Oponentka velmi oceňuje, že práce byla studentkou vypracována samostatně, osvojila si nezvykle velké množství metod, díky nimž nové poznatky o patogenním potenciálu cerkárií ptačích schistosom k vyvolání cerkáriové dermatitidy. *Proto jednoznačně doporučuji předloženou práci přijmout jako práci diplomovou a doporučuji ji k obhajobě.*

V Praze dne 25. srpna 2022

prof. RNDr. Libuše Kolářová, CSc.  
Ústav imunologie a mikrobiologie 1. LF UK  
Studničkova 7, 128 00 Praha 2