



V Praze dne 21. 5. 2024

Posudek na diplomovou práci Lydie Sklenářové

Diplomová práce Lydie Sklenářové zkoumá vliv antibiotiky navozené mikrobiální disbiózy na mikrobiotu samotnou, na permeabilitu střevní stěny a na vývoj neutrofilů v kostní dřeni. Zároveň autorka měří vliv podání bakterie EcO83 na antibiotiky navozenou disbiózu a na další výše popsané parametry. Diplomová práce je psaná v českém jazyce a je standardně členěná. Autorka se bohužel nevyvarovala stylistických neobratností, použití laboratorního žargónu nebo překlepů, které se vyskytují ve větší než akceptovatelné míře (namátkou: str. 51: „*analyzovat expresi genů souvisejících s funkcí a pohotovostí neutrofilů*“, str.54: „*proteiny těsného spojení*“, „*Prozánětlivé cytokiny IL-1 β a TNF- α po podání antibiotik vyšly signifikantně vyšší oproti kontrolám*“ nebo na str. 54: „*Obecně geny asociované s TJ v tenkém střevě vykazovaly po podání probiotik významné zotavení*“). Tato vyjádření vedla k pobavení oponenta a jistě pobaví i samotnou komisi. Nejedná se o šťastná vyjádření a odborný text by jich měl být nejlépe prostý. Naštěstí tyto neobratnosti většinou nad míru neznesnadňují pochopení samotného textu.

Literární úvod je dobrým základem pro experimentální část. Obzvláště bych chtěl vyzdvihnout dvojici tabulek popisující vliv antibiotik na mikrobiotu, případně asociaci jednotlivých znaků s efektorovou funkcí neutrofilů. Tyto části práce jsou velmi informačně bohaté a dobře zpracované.

Následuje metodická část práce, kde je mírně nešťastně ukrytý design celého experimentu, z mého pohledu by bylo lepší tuto část přesunout a otevřít s ní výsledkovou část. Metodická část je celkově zpracována vysoce pečlivě.

Experimentální část dokumentuje provedené experimenty. Ať už se jedná o složení mikrobiomu, analýzu neutrofilů v kostní dřeni pomocí průtokové cytometrie nebo expresní profilování vybraných genů ve střevě pomocí qPCR. K této části mám spolu s částí diskuze asi největší počet dotazů.

1. Autorka považuje myši, kterým byly podány antibiotika, za dysbiotické. Lze dojít k tomuto závěru na základě v práci prezentovaných (nejen sekvenačních) dat?
2. Autorka prezentuje FACS-gatovací strategii neutrofilů (Obr.7). Gatovací strategie je sice založena na FMO kontrolách, nicméně populace jsou velmi arbitrárně gatovány (skrz středy populací) a dále jsou



analyzovány frekvence jednotlivých arbitrárně vzniklých populací. Z mého pohledu by bylo lepší data prezentovat jako změnu v MFI pro CXCR2 a CD62L na celé populaci granulocytů (nejen pro CD62L pozitivní neutrofile jak je uvedeno v obrázku 12E – mimochodem je toto správně? Následný obrázek 12G pak dle popisu ukazuje CD62L na celé populaci granulocytů?). Může autorka komentovat tuto diskrepanci v její práci a prezentovat během obhajoby data založená na změně MFI CXCR2 a CD62L na celé populaci neutrofilů pro jednotlivé experimentální skupiny?

3. V návaznosti na předchozí experiment – v literatuře se standardně využívá odlišný experimentální přístup pro měření vývoje a mobilizace granulocytů z kostní dřeně pomocí průtokové cytometrie (emergency granulopoiesis). Chtěl bych poprosit autorku o porovnání výše zmíněného přístupu s Vámi využitým přístupem. Můžete zmínit výhody a nevýhody jednotlivých přístupů?

Korelační matice na Obr. 12F přechází představení primárních qPCR dat (Obr. 13). toto řešení není pro čtenáře příliš komfortní, stejně jako představení výsledných grafů (např. Obr. 12A-E před reprezentativní FACS ploty – Obr. 12G, H).

4. Na Obr. 13 autorka prezentuje výsledky exprese vybraných genů na vzorcích kostní dřeně pomocí qPCR. Vzhledem k distribuci dat a množství měření ($n=1$, v některých skupinách pouze 3 zvířata) bych se chtěl zeptat na využitý statistický test (není přímo v obrázku uveden a v metodice je komplexní výčet jednotlivých použitých testů pro celou práci). Považuje autorka opravdu za prokázanou zvýšenou expresi *Il1b*, *Tnfa*, *Il10*, *Tlr2* atd. ve skupině zvířat, kterým byly podávána antibiotika. Lze vzhledem k distribuci dat považovat toto měření za významné? Může autorka komentovat rozdílné počty měření – zvířat (například kontrola (K) nebo ATB *Il1b* vs. *Tnfa*)? Byly některá data naměřena a později vynechána? Pokud ano, na základě jakého kritéria nebo kritérií? Dále bych poprosil autorku, aby při prezentaci uváděla u všech vyhodnocení experimentů použité statistické metody.

5. Dále bych autorku chtěl poprosit o komentář k obrázku 14 D, který je interpretován jako pozitivní korelace mezi expresí genů *Il1b* a *Cldn5*. Může se autorka zaměřit v komentáři na distribuci jednotlivých bodů? Vede nárůst v expresi *Il1b* k nárůstu exprese genu pro *Cldn5*? Jaký je vztah distribuce jednotlivých bodů k v grafu vyznačeným „křivkám“. Je pro interpretaci významné, že body leží mimo tyto „křivky“?

Následuje kapitola diskuze, která zevrubně a detailně komentuje naměřená data a snaží se je zasadit do kontextu publikovaných studií. Tato část práce je detailně zpracovaná. Zvláště bych chtěl vyzvednout závěrečnou část věnovanou limitacím předkládané experimentální práce. I k této části mám několik (spíše interpretačních otázek).



6. Chtěl bych autorku poprosit o komentář k následujícímu tvrzení „*V neposlední řadě stojí jistě za zmínku, že námi pozorované změny v mikrobiotě mohou být ovlivněné i odlišným bakteriálním osídlením mezi jednotlivými zvířaty ve zvěřinci a jejich dodavateli, jak bylo popsáno v případě SFB a Th17 imunitní odpovědi*“ Všechny zvířata dle kapitoly metody pocházejí ze stejného zvěřince, nebo tomu tak nebylo? Je zde nějaký důvod, který by mohl zavdat k takovéto odlišnosti?

7. Jak si technicky představujete vliv disbiózy na TLR2 signalizaci v kostní dřeni, poukazují Vaše experimenty opravdu na aktivaci Tlr2 signální dráhy v kostní dřeni? „*Naše práce ukazuje, že dysbióza indukovaná antibiotiky, indukovala zánětlivé zvýšené zánětlivé cytokiny, jako IL-1 β a TNF- α , zvláště v tenkém střevě a kostní dřeni, spolu s aktivací signálních drah jako je TLR2 v kostní dřeni a TLR4 v tenkém střevě.*“

Předložená práce splňuje náležitosti pro diplomovou práci v oboru Imunologie a plně ji doporučuji k obhajobě. Její ohodnocení nechávám na komisi v závislosti na výkonu autorky u obhajoby a na základě odpovědí na výše uvedené otázky.

Jan Dobeš