



**Fakulta vojenského zdravotnictví Univerzity obrany  
Ústav molekulární patologie**

**Třebešská 1575, 500 01 Hradec Králové  
Tel.: 973 253 223, Fax: 495 513 018**

---

## **Oponentský posudek disertační práce**

Název práce:

**Ovlivnění infekce *Francisella tularensis* LVS *in vitro* působením interferonu gama a lipopolysacharidu**

Předkládá: Mgr. Monika Holická

Univerzita Karlova v Praze, Lékařská fakulta v Hradci Králové,  
DSP Lékařská imunologie

Zadání tématu předložené disertační práce bylo podmíněno řešením projektu s názvem "Proteomové centrum pro studium intracelulárního parazitismu bakterií" financovaného MŠMT v letech 2000-2004. Hlavním cílem řešitele tohoto projektu (prof. Jiří Stulík, Univerzita obrany, Hradec Králové) a spoluřešitelů (prof. Miroslav Červinka a prof. Jan Krejssek, Lékařská fakulta, Hradec Králové a dr. Bořivoj Vojtěšek, Masarykův onkologický ústav, Brno) bylo vybudování proteomového centra se zaměřením na studium molekulárních interakcí v průběhu časné fáze infekce eukaryotických buněk a organismů. Mgr. Holická se stala členkou výzkumné skupiny vytvořené na Lékařské fakultě a vedené prof. Janem Krejskem. Svou prací významně přispěla k řešení problematiky interakce intracelulární bakterie s hostitelskou buňkou a tím i pomohla řešit výše uvedený projekt. Téma disertační práce je stále velmi aktuální. Pro příklad uvádím dva důvody, které naznačují aktuálnost vybraného tématu: (1) molekulární mechanismy, které probíhají při interakci bakterie s hostitelskou buňkou nejsou zcela vyřešeny a (2) stále neexistuje účinná, definovaná a licencovaná vakcína proti tularemickému onemocnění.

Cílem hodnocené disertační práce bylo charakterizovat primární interakci fagocytujících hostitelských buněk s intracelulární bakterií *Francisella tularensis* kmen LVS. Tento hlavní cíl naplňovaly tři specifické cíle: (1) sledovat proliferaci bakterie a určit její generační čas v *in*

*in vitro* kultuře, (2) sledovat stabilitu *in vitro* systému, (3) sestavit jednoduchý buněčný model intracelulární proliferace mikrobů ve fagocytujících buňkách.

Práce je standardně členěna do následujících kapitol: úvod, materiál a metody, výsledky a diskuse. V úvodu je charakterizována bakterie *F. tularensis* jak z hlediska taxonomie či epidemiologie, tak i z hlediska klinických projevů onemocnění vyvolaného touto bakterií. Náhled na tuto problematiku je veden na úrovni genomu i proteomu této bakterie. Dále jsou zde shrnuty literární poznatky známé z interakce bakterie s hostitelskou buňkou, včetně odpovědi hostitele na infekci (buněčná a protilátková odpověď).

Metody zvolené k řešení problematiky byly logicky sestavené tak, aby splňovaly definované cíle práce, byly v souladu s experimentálními *in vitro* modely proliferace *F. tularensis* v hostitelských buňkách uváděnými v literatuře a mohly být standardizovány. V rámci této práce byla sledována proliferace bakterie v buňkách J774.2, které byly stimulovány IFN- $\gamma$  a/nebo LPS. Po stimulaci buněčné linie před nebo po infekci byla sledována produkce cytokinů a chemokinů, životnost buněk a koncentrace nitritů.

V rozsáhlé výsledkové části členěné do pěti podkapitol jsou postupně, ke každému specifickému cíli zvlášť, uváděny experimentálně získané hodnoty zpracované do přehledných tabulek a grafů doplněných statistickými analýzami. Velmi kladně hodnotím jasnou a srozumitelně napsanou interpretaci získaných výsledků. Za nejcennější kapitolu této práce považuji diskusi, která je opět rozdělena do podkapitol I – IV provázaných s danou částí výsledků. Autorka zde ukazuje nadhled nad řešenou problematikou, dává své konkrétní výsledky do kontextu s literárními údaji a vytváří své vlastní názory v případech, kdy získala odlišné či zcela nové výsledky. Mezi nově získané výsledky patří odhalení protektivního vlivu IFN- $\gamma$  jak samotného, tak v kombinaci s LPS na proliferaci *F. tularensis* LVS v hostitelských monocyto-makrofágových buňkách J774.2. Stejný efekt, potlačení proliferace bakterií, byl potvrzen při dlouhodobé stimulaci hostitelských buněk před infekcí, kdy dávky IFN- $\gamma$  a LPS byly několikanásobně nižší ve srovnání s jejich dávkováním u rozvinuté infekce.

**Dotaz oponenta k obhajobě disertační práce:** Ve své práci popisujete zajímavý průběh experimentu, kdy po třech hodinách infekce buněk J774.2 předem stimulovaných IFN- $\gamma$  a

LPS došlo ke statisticky významné intracelulární akumulaci bakterií, která se pak v dalších intervalech už neprojevila. Mohla byste vyjádřit svůj názor na tento jev?

**Závěr:** Předložená disertační práce splnila sledované cíle a přispěla k dalšímu objasnění vztahu bakterie *F. tularensis* k hostitelské buňce. Pomocí produkce sledovaných cytokinů a chemokinů bylo popsáno chování infikovaných buněk ovlivněných IFN- $\gamma$  a/nebo LPS. Mgr. Monika Holická získané výsledky úspěšně publikovala v časopisech s IF, v recenzovaných časopisech a prezentovala na mnoha národních i mezinárodních vědeckých fórech.

**Předložená disertační práce Mgr. Moniky Holické splňuje požadavky standardně kladené na disertační práce a jednoznačně doporučuji její přijetí k obhajobě.**

doc. Ing. Lenka Hernychová, Ph.D.  
Fakulta vojenského zdravotnictví  
Univerzita obrany Hradec Králové

V Hradci Králové 31. 5. 2010