

Review of the Ph.D. thesis

Life cycle of the free-living amoeba. Differentiation of amphizoic amoebae of the genera
Acanthamoeba and *Balamuthia*

by Jarmila Klieščíková, MD.

The Ph.D. thesis focuses on amoebae *Acanthamoeba* spp. and the species *Balamuthia mandrillaris*, the genera of free-living amoebae that can cause devastating or even lethal infections in humans. Occurrence of *Acanthamoeba* keratitis has been increasing both in the Czech and Slovak Republics; moreover, the first case of *Balamuthia* encephalitis was documented in the Czech Republic. As it is stated in the thesis, the therapy of human diseases caused by the species of both amoebae genera is often unsuccessful due to the formation of highly resistant cysts and their presence in affected tissues. Dr. Klieščíková focuses on the study of differentiation of cysts from trophozoites, and therefore I consider the topic as highly actual and important. The thesis consists of 70 pages. The first chapter comprises rich and clearly arranged literature review, where the author has presented the relevant issues comprehensively and concisely. The thesis includes the most current studies concerning the issue of composition and biosynthesis of cyst wall in unicellular organisms, fungi and cell wall of plants. Following parts are dedicated to two sister organisms *Acanthamoeba* spp. and *B. mandrillaris*. The author presents the knowledge on classification of both genera, their ecology, life cycles, diseases caused by both amoebae and treatment options. The final part of the first chapter deals with the information about cyst formation and cyst wall composition, molecular and biochemical nature of encystation and studies discussing cyst resistance. The introduction chapter ends with the subchapter 1.5.10 'Contact lenses and *Acanthamoeba* keratitis cases'. I recommend that the subchapter be moved after the part 1.5.4.2 '*Acanthamoeba* keratitis' as the subchapter 1.5.4.3.

The results of the study of Dr. Klieščíková are very valuable. They document author's skills of conceptual scientific work, her broad professional scope and advanced level of knowledge regarding the issue of free living amoebae, especially in the studying and understanding the mechanisms of *Acanthamoeba* spp. and *B. madrillaris* encystation, some of which are of great significance. It concerns the author's first detection of β -1,3-1,4-glucan (lichenin) in acanthamoebae endocyst and the first description of the next dormant stage of

acanthamoebae – pseudocyst. Dr. Klieščiková described the conditions of its formation and its structure. Of great practical importance for ophthalmology and contact lens wearers is the discovery of induction of pseudocyst formation by propylene glycol even in contact lens solution, where it is contained. The author states: „... pseudocyst formation in contact lens solution have a significant impact on the survival of amoebae: it may represent the source of trophozoites which are recruited when establishing the infection ... (p. 48)“. The number of *Acanthamoeba* keratitis cases also increases in Slovakia, 9 out of 10 recorded documented cases are the wearers of contact lenses. The results of the thesis have a great importance for practical use, especially for producers of contact lens solutions. Is there any available control of solution effectiveness in order to prevent pseudocyst formation?

The Text section is suitably supplemented with graphs and figures, though their numbering scheme would be helpful for a reader's better orientation.

In the Summary of results chapter, the author presents an extensive summary of results achieved in her work. Respectable amount of literary sources (228) demonstrates the author's in-depth knowledge of the issue.

The presented Ph.D. thesis represents, concerning the content and formal part of the work, a highly valuable scientific document and there are no shortcomings that I am aware of. The thesis is neatly arranged, without any typing errors, in a concise and comprehensive scientific way.

Questions:

1. What is the current situation in terms of number of cases and therapies of *Acanthamoeba* spp. and *B. mandrillaris* infections in the Czech Republic?
2. What is the function of abnormally large vacuole of pseudocyst regarding the fact that acidification of cytoplasm has a fundamental protective importance for the pseudocyst?
3. Please list other unicellular organisms, where the Golgi apparatus plays such an important role in encystation as in *Acanthamoeba* spp.?
4. Have you also observed the formation of pseudocysts after applying other chemical compounds against trophozoites of *Acanthamoeba* spp. Besides methanol, dimethyl

sulfoxide, acetone and propylene glycol? Have you tried application of mentioned compounds also on the *Balamuthia mandrillaris* trophozoites?

5. On Page 50 it is stated that your results did not confirm the presence of cellulose as postulated by Siddiqui *et al.* (2009). Is it possible to explain this discrepancy not only by different sensitivity of the methods used (as you have mentioned in your thesis), but also by the difference between the examined isolates?

The presented Ph.D. thesis is certainly a high-quality scientific work and I have no substantive comments to make in relation to it; it is a valuable contribution both for the practical use and further research of free living amoebae. It shows author's rich professional knowledge and skills, and therefore **I fully recommend** the presented thesis of MD. Jarmila Klieščíková for the defence.

Bratislava, May 5, 2013

Assoc. Prof. František Ondriska, Ph.D.

HPL (Ltd), Department of Parasitology

Istrijská 20

841 07 Bratislava

Slovakia

Review

On Ph.D Thesis MD. of Jarmila Klieščíkova

Life cycle of the free-living amoeba. Differentiation of amphizoic amoebae of the genera
Acanthamoeba and *Balamuthia*

MD. Jarmila Klieščíková sa v dizertačnej práci zaoberá voľne žijúcimi meňavkami *Acanthamoeba* spp. a druhom *Balamuthia mandrillaris*, ktoré spôsobujú devastujúce až smrteľné ochorenie človeka. Akantamébová keratitída zaznemanáva nárast v Českej i Slovenskej republike, v Českej republike bol zaznamenaný prvý prípad encefalítidy spôsobenej *Balamuthia* encephalitis.. Ako autorka konštatuje vo svojej práci, terapia ochorení človeka spôsobených druhmi oboch rodov meňaviek je často neúspešná, čoho dôvodom je tvorba odolných cýst a ich prítomnosť v postihnutých tkanivách. Práve štúdiom diferenciácie cýst z trofozoitov sa zaoberá dr. Klieščíková vo svojej práci, preto tému považujem za vysoko aktuálnu a významnú. Práca je napísaná na 70 stranach. Úvodná kapitola predstavuje bohatú bibliografickú dokumentáciu, v ktorej autorka dokázala erudovane, citlivo a s prehľadom prezentovať jednotlivé oblasti tvoriace vlastnú podstatu práce. Nechýbajú najnovšie práce týkajúce sa problematiky kompozície a biosyntézy steny cýst jednobunkovcov, Fungi i plant cell wall. Ďalšie časti sú venované dvom sesterským organizmom *Acanthamoeba* spp a *B. mandrillaris*. Uvádzza prehľad poznatkov o klasifikácii oboch rodov, ekológiu, životných cyklov, ochoreniach spôsobených oboma rodmi meňaviek a ich liečbe. Záver úvodnej kapitoly je venovaný poznatkom tvorbe cýst a kompozícií steny cýst, molekulárnej a biochemickej podstate encystácie a prácам pojednávajúcim o rezistencii cýst. Kapitola Introduction končí podkapitolou 1.5.10 Contact lenses and *Acanthameba* keratitis cases. Podľa môjho názoru, táto podkapitola mohla byť zaradená za časť 1.5.4.2 *Acanthamoeba* keratitis ako podkapitola 1.5.4.3.

Veľmi cenné sú výsledky štúdie ku ktorým dospela MD. Klieščíková. Dokumentujú autorkine schopnosti dlhodobej a koncepcnej vedeckej práce, širokú odbornú rozhladenosť a vyspelosť v rozsiahlej problematike voľne žijúcich meňaviek,

najmä v štúdii a objasnení mechanizmov encystácie *Acanthamoeba* spp. a *B. mandrillaris*, z ktorých niektoré majú prioritný význam. Týka sa to prvej detekcii β -1.3-1,4-glukanu (licheninu) v endocyste akantaméb a prvýkrát popísala u akantaméb ďalšie dormatntné štadium – pseudocystu. Opísala podmienky jej vzniku a štruktúru. Praktický význam pre oftalmológiu a nosičov kontaktných šošoviek má zistenie, že tvorba pseudocýst môže byť indukovaná propylénglykolom aj v roztokoch na čistenie kontaktných šošoviek, ktoré ho obsahujú. V práci uvádzate: „..pseudocyst formation in contact lens solutions have a significant impact on the survival of amoebae: it may represent the source of trophozoites which are recruited when establishing the infection..(s. 48).“ Počet prípadov AK sa zvyšuje aj na Slovensku, zaznamenaných je 10 ochorení z toho 9 bolo nosičov kontaktných šošoviek. Vaše výsledky sú veľmi významné pre prax najmä pre výrobcov roztokov pre KŠ (contact lens solution). Existuje kontrola účinnosti týchto roztokov na zabránenie tvorby pseudocýst ?

Textovú časť vhodne dopĺňajú grafy a obrázky, k lepšej orientácii čitateľa by pomohlo ich očíslovanie.

V kapitole Summary of results autorka habilitačnej práce prezentuje rozsiahly súhrn výsledkov ku ktorým dospela vo svojej práci. Úctyhodný počet literárnych prameňov – 228 svedčí o autorkinom prehľade a orientácii v predmetnej problematike.

Dizertačná práca dr. Klieščikovej po obsahovej i formálnej stránke predstavuje vysoko hodnotný vedecký dokument, nedostatky v práci nenachádzam takmer žiadne. Práca je písaná úhľadne, bez preklepov, stručne, jasne a pekným vedeckým spôsobom.

K práci mám otázky:

1. Aká je súčasná situácia z hľadiska počtu prípadov a terapií akantamébových a balamuthiových infekcií v Českej republike?
2. Aká môže byť funkcia abnormálne veľkej vakuoly pseudocysty vzhľadom na fakt, že acidifikácia cytoplazmy má zásadný protektívny význam pre bunku vo fáze pseudocysty?

3. U ktorých ďalších jednobunkovcov zohráva Golgiho aparát takú významnú rolu pri encystácii ako u akantaméb?
4. Pozorovali ste vznik pseudocýst aj po aplikácií iných chemických zlúčenín ako metanol, dimethylsulfoxid, acetón a propylénglykol na trofozoity akantaméb? Skúšali ste aplikovať spomenuté zlúčeniny aj na trofozoity *Balamuthia mandrillaris*?
5. Na str. 50 píšete, že Vaše výsledky nepotvrdili prítomnosť celulózy, ktorú predpokladal Siddiqui et al. (2009). Je možné vysvetliť túto diskrepanciu nielen rozdielnou citlivosťou použitých metód (ako v práci píšete), ale aj rozdielmi medzi skúmanými izolátmami?

Predloženú dizertačnú prácu považujem za hodnotné vedecké dielo, je svojou kvalitou prínosom pre praktické využitie i pre ďalší rozvoj výskumu v problematike voľne žijúcich améb. Svedčí o autorkinej vysokej odbornej erudícii, preto odporúčam písomnú prácu MD Jarmily Klieščíkovej k dizertačnej skúške a po úspešnej obhajobe priznať titul „PhD“.

V Bratislave, 16. 5. 2013

František Ondriska, PhD. assoc prof.

HPL (Ltd), Department of Parasitology
Istrijská 20
841 07 Bratislava