

## Oponentský posudek diplomové práce

*Bc. Natalie Galanové*

### ***Vliv mikrobiomu na patogenezi střevních onemocnění***

Předkládaná diplomová práce se zabývá aktuální tematikou a představuje dílčí úsek studia patogeneze střevních onemocnění.

V rozvinutých průmyslových zemích stále přibývá množství pacientů trpících nespecifickými střevními záněty a kolorektálním karcinomem. Patogeneze těchto onemocnění není dosud zcela známa. Bylo popsáno, že vývoj těchto zánětlivých onemocnění ovlivňují nejen určité bakteriální kmeny, které jsou součástí střevního mikrobiomu, ale že velkou roli hraje také zde zkoumaný mykobiom.

**Abstrakt** přináší celkový nástin studované problematiky. Domnívám se však, že autorka měla více dbát na gramatickou vyváženost, neboť např. použití sloves v různých časech a drobné překlepy, dělají tuto úvodní část poněkud nesrozumitelnou. Podobně je tomu i v anglické verzi abstraktu.

**Literární přehled** předkládané práce dokazuje, že se autorka v dané problematice velmi dobře orientuje. Práce má dobrou koncepci a cíle jsou jasně formulovány.

Použité **metody** jsou vhodné, jejich popis je však leckdy zdlouhavý až ke ztížené srozumitelnosti. Autorka se podrobně zabývá validací metodiky pro zpracování získaných vzorků a způsoby jejich uchování při různých teplotách. Pro stanovení složení mykobiomu používá autorka jak sekvenační, tak i kultivační techniky. Popisuje podrobně pěstování hub na různých základech a při rozdílných teplotách. Při „in vitro“ pokusech byla použita myší makrofágová buněčná linie, kterou autorka stimulovala lyzáty vybraných hub. Tyto kultury byly následně analyzovány imunologickými metodami jako je průtoková cytometrie (FASC), kolorimetrická analýza, enzymatická imunoanalýza (ELISA) a Griessova reakce. V kapitole 3.1. „Molekulární analýzy“ je sice uveden počet pacientů s CRC (32) a 127 vzorků stolice pacientů s IBD s různými schématy léčby, ale postrádám zde popis způsobu výběru testovaných pacientů. V kapitole 3.3. „Kultivace“ jsou naopak uvedeni jen dva vybraní pacienti s onemocněním a jen jedna zdravá kontrola, která je dokonce o několik desítek let starší než testovaní pacienti!

**Výsledky práce** jsou přínosem pro poznání složení mykobiomu a mikrobiomu, který se vyskytuje u pacientů s určitými chorobami. Z výsledků sekvenací na úrovni tříd je patrné, že v biopsiích pacientů s kolorektálním karcinomem (CRC) dochází k významnému nárůstu Saccharomycetes na rozdíl od vzorků pacientů bez karcinomu, kde došlo k významnému úbytku v Agaricomycetes. Jsou uvedeny také výsledky sekvenací bakterií pacientů s IBD. Tyto údaje však mají pouze ilustrační charakter, protože jak udává autorka, nestihla je statisticky zpracovat.

Autorka uvádí, že: „Sekvence bakteriálního mikrobiomu u pacientů s CRC ukázalo na významný pokles u Firmicutes a v menší míře i Bacteroides na druhou stranu byl ukázán velký nárůst pro Fusobakteria v tkáni tumoru. U jednotlivých rodů je nejvýznamnější nárůst v tumoru pro Fusobacterium, Leptotrichia, Eikenella a Campylobacter. Naopak pokles byl zaznamenán u Helococcus a Blautia. Zajímavé jsou změny poměrů pro rod Clostridium, kdy někteří jeho zástupci vykazují signifikantní pokles a jiní naopak nárůst v tkáni tumoru pacientů s CRC“.

Výsledky z kultivací jsou zkráceny již zmíněným nedostatečným počtem pacientů, nicméně je zde položen základ pro další studie. Zajímavé je i porovnání rodového překryvu při použití sekvenačních metod Illumina a Sanger.

Analýza s použitím průtokové cytometrie napomohla při zjištění výrazného imunomodulačního působení houbových lyzáátů (z pacientů) na makrofágy makrofágové buněčné linie. Tyto lyzáaty hub aktivovaly antigen prezentující buněk (CD80, CD86, CD40). Zde se ukázaly silně prozánětlivé vlastnosti kvasinky *Candida parapsilosis* a vláknitého druhu *Mucor plumbeus*. *Candida albicans* pak vykazovala nejsilnější imunitní odpověď v makrofágové myší linii, kde byla stanovena jak změněná produkce NO<sub>2</sub>, tak i produkce zánětlivých cytokinů TNF- $\alpha$  a IL-6.

V **diskuzi** jsou výsledky kriticky zhodnoceny ve vztahu k výsledkům jiných autorů a jsou vhodně interpretovány z hlediska nových poznatků patogeneze kolorektálních karcinomů a nespecifických střevních zánětů. Zdá se, že vliv mykobiomu je nepochybný.

Zde bych chtěl položit několik otázek:

- 1) Jakým způsobem byl proveden výběr pacientů, jejichž vzorky byly sekvenovány i kultivovány. Byli tito pacienti již léčeni, anebo se podařilo také zachytit pacienty bez léčby v raném stádiu vývinu onemocnění?

- 2) U pacientů s kultivovanými vzorky je velký rozdíl se zdravou kontrolou. Je známý literární údaj o změně mykobiomu v průběhu života člověka?
- 3) Ve své práci jste optimalizovala předanalytickou fázi kultivačních analýz mykobiomu. Jak probíhá analýza mykobiomu v klinické praxi? Stanovuje se?
- 4) Má složení diety vliv na změnu mykobiomu?

Za nedostatek práce, který sice nesnižuje její vědecký přínos, ale zarmucuje čtenáře, pokládám nedbalou češtinu - chyby, překlepy a místy špatně srozumitelnou stylizaci.

### **Závěr**

Autorka předloženou prací prokázala dobrý přehled v oboru, schopnost tvůrčí práce a dobré technické zvládnutí náročných metod. Získala řadu původních výsledků. Domnívám se, že práce výrazně překračuje rozsah běžné diplomové práce a sama autorka se chystá v započatém díle dále pokračovat. Bylo dosaženo vytčených cílů, a proto doporučuji práci k obhajobě a hodnotím stupněm 2 a v případě excelentního zodpovězení otázek navrhuji stupeň 1.

Ing. Tomáš Hudcovic, CSc.

Laboratoř gnotobiologie

Mikrobiologický ústav České akademie věd, v. v. i.

V Novém Hrádku dne 29. 5. 2017