



**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:

Infekce makrofágové linie J774.2 bakterií *Francisella tularensis* LVS – změny membránových a nitrobuněčných molekul

Předkládá: MUDr. Jakub NOVOSAD

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

Tato disertační práce byla řešena v rámci grantu MŠMT ČR, č. LN00A033 “Proteomové centrum pro studium intracelulárního parazitismu bakterií“ s další podporou výzkumného záměru MSM VZ 0021620812. Hlavním zaměřením Proteomového centra bylo studium časně fáze interakce hostitelských buněk a patogenní intracelulární bakterie. MUDr. Jakub Novosad vypracoval svoji disertační práci pod vedením školitelky MUDr. Ireny Krčmové, CSc., a přednosty Ústavu klinické imunologie a alergologie FN HK prof. RNDr. Jana Krejska, CSc.. Tato práce přispívá k objasnění základních informací týkajících se interakce intracelulární, gram-negativní bakterie *Francisella tularensis* s hostitelskými buňkami, v tomto případě s monocyto-makrofágovou linií J774.2. Přesto, že je v poslední době tato oblast v centru zájmů mnoha řešitelských týmů, zatím není patogenese bakterie *F. tularensis* zcela objasněna. MUDr. Novosad udělal nejen svými výsledky, ale hlavně jejich interpretací použitím komplexního statistického testování, krůček k dalšímu porozumění molekulárním mechanismům interakce *F. tularensis* s hostitelskou buňkou

Cílem hodnocené disertační práce bylo 1/ vytvořit *in vitro* model infekce *F. tularensis* LVS (live vaccine strain), 2/ zjistit specifické změny exprese některých aktivačních povrchových molekul linie J774.2 v závislosti na infekci, 3/ zjistit, jestli je možné eliminovat infekci stimulací makrofágů, 4/ pomocí monitorování exprese aktivačních povrchových

molekul předpovídat průběh infekce 5/ charakterizovat vliv stimulace na interakci, 6/ zjistit existenci korelátu specifické exprese aktivačních molekul hostitelských buněk s interakcí bakterií a 7/ zjistit aplikovatelnost výsledků v klinice.

Práce je sepsána v rozsahu 153 stran, je standardně členěna do následujících kapitol: úvod a cíl práce, teoretická část, experimentální část, výsledky, zhodnocení výsledků a diskuze, závěr, literatura a přehled publikační činnosti autora. Rozsah použitých zkratk je odpovídající.

V teoretické části je charakterizována bakterie *F. tularensis* z hlediska taxonomie, epidemiologie, a jsou zde uvedeny všechny známé poznatky o průběhu primární infekce *F. tularensis*. Poměrně obsáhlá část je věnována obecnému konceptu interakce mezi intracelulárními parazity a imunitním systémem (strategie bakterií k osídlení hostitelských buněk, obranné mechanismy hostitelské buňky, fagocytóza, aktivace a signalizace makrofágů, atd.). Zvláště významné pro tuto práci je shrnutí informací o inflamazomu, signalizaci zprostředkovanou $\text{IFN}\gamma$ a lipopolysacharidy a úloze oxidu dusnatého ve vztahu k intracelulárním bakteriím.

V experimentální části je uvedena charakteristika a způsob měření zvolených povrchových znaků CD54, CD16/32 a CD86, metodologické poznámky k detekci NO a CFU. Buňky J774 byly infikovány bakterií *F. tularensis* LVS (MOI 100) a to buď bez stimulace, před nebo po stimulaci. Ke stimulaci byly použity $\text{IFN}\gamma$, LPS z *E. coli* nebo koktejl obou. V časech 0, 3, 6, 9 a 24 hodin byla změřena exprese jednotlivých povrchových molekul, produkce NO makrofágy a proliferace bakterií. Pro analýzu získaných výsledků (získaná jak v opakovaných měřeních, tak v nezávislých měřeních) byla použita komplexní analytická metoda smíšená faktoriální ANOVA konceptualizovaná spolu s mnohočetnou regresí do obecného lineárního modelu.

Výsledky exprese povrchových znaků jsou vyjádřeny ve formě histogramů a do analýz byly brány MFI (median fluorescence intensity), proliferace bakterií je vyjádřena jako CFU (colony forming unit) a produkce NO měřeného Griessovým činidlem je pomocí referenčních standardních roztoků vyjádřena v $\mu\text{M/l}$.

V kapitole zhodnocení výsledků jsou analyzovány výsledky pro jednotlivé parametry zvláště i v kombinaci mezi sebou: exprese CD54, CD16/32, CD86, produkce NO a proliferace bakterií. Díky použití sofistikovaného statistického programu ANOVA byly zjištěny velmi zajímavé souvislosti mezi jednotlivými komponenty a proměnnými. Z mnoha

uvedených, statisticky významných korelací, bych některé ráda uvedla. Například na podkladě vypočtených hodnot je možné tvrdit, že pokud bylo MFI pro CD54 větší než 37,9, pak je možné se 100% senzitivitou (dochází k ní pokaždé, má-li být infekce eliminována) a 73.3% specifickou (k indukci dochází i za jiných situací, které ale nemusí vést k eliminaci infekce) tvrdit, že za 24 hodin po infekci dojde k úplné eliminaci infekce. Toto je názorný příklad možného využití v klinické praxi, ke kterému bychom bez použití komplexního statistického programu nikdy nedošli. Podobným způsobem byla stanovena prediktivní hodnota produkce NO ve 24. hodině. V další analýze bylo hodnoceno, které z kontrolovaných vnějších faktorů vedou k parametrům s výpovědní hodnotou ve smyslu predikce chování infikovaných a stimulovaných buněk. Díky výsledkům ANOVA je zřejmé, že daleko větší efekt na výslednou hodnotu u všech tří sledovaných parametrů (MFI CD54 v 6h, MFI CD86 za 24h, MFI CD54 6h x MFI CD86 24h) má zvolené stimulační agens (tj. žádné, LPS, IFN γ či kombinace LPS+IFN γ) ve srovnání s efektem modelu infekce a stimulace (tj. žádná infekce, infekce po stimulaci, infekce před stimulací a samotná infekce).

V závěru je dostatečně a jasně zodpovězeno 7 základních cílů této disertační práce. Byl vytvořen a mnohokrát ověřen fungující model infekce *F. tularensis* na myší monocytomakrofágové linii J774.2. Infekce zásadním způsobem zasahuje do fyziologických mechanismů hostitelské buňky, což je možné prokázat reprodukovatelnými a měřitelnými specifickými změnami v expresi povrchových molekul a produkci NO v různých časových intervalech, přičemž tyto změny korelují s eliminací bakterií.

Dotazy oponenta k obhajobě disertační práce: 1/ Velmi mě zaujala použitá komplexní statistická analýza. Mohl by jste zjednodušeně vysvětlit význam použitých modelů a testů? 2/ Samotná infekce nevyvolávala oproti kontrolním buňkám významné změny v expresi povrchových molekul na rozdíl od stimulace IFN γ , LPS či jejich kombinací. V teoretické části 2.4.2.2.3. uvádíte, že intracelulární patogeny dokáží blokovat NF κ B (což bylo prokázáno i u *F. tularensis*), ale ne signální cestu JAK/STAT aktivovanou IFN γ – IFN γ R1 a 2. Měl by jste vysvětlení pro snížení exprese jednotlivých povrchových znaků stimulovaných buněk po přidání infekce?

Závěr: MUDr. Jakub Novosad získané výsledky úspěšně publikoval v časopisech s IF, v recenzovaných i nerecenzovaných časopisech a prezentoval je na mnoha národních i

mezinárodních vědeckých fórech. Předložená disertační práce splnila dané cíle a zodpověděla zadané otázky, které si v úvodní části kladla. Jedná se o unikátní práci v tom slova smyslu, že pro biologický systém použila komplexní statistické zpracování, což je v obdobných pracích ojedinelé. Díky tomu se však objevují statisticky významné korelace, které by jinak nebylo možné získat. Kromě toho přispěla tato práce k novým poznatkům týkající se objasnění vztahu bakterie *F. tularensis* k hostitelské buňce. Tuto práci hodnotím velmi kladně a doporučuji takto předložené statistické analýzy aplikovat v širším měřítku i u ostatních prací, ve kterých se získává větší počet dat v rámci několika parametrů a proměnných.

Předložená disertační práce MUDr. Jakuba Novosada splňuje požadavky standardně kladené na disertační práce a jednoznačně doporučuji její přijetí k obhajobě.

mjr. RNDr. Zuzana Kročová, Ph.D.
Fakulta vojenského zdravotnictví
Univerzita obrany Hradec Králové

V Hradci Králové 31. 5. 2010