

Posudek práce k získání titulu Ph.D

Mgr.Barbora Bílková : Variability of the domestic breeds in selected immunological traits of hen and egg.

Oponent: Ing Jiří Plachý, Csc

Přehledné studie se zaměřením na různá „primitivní“ plemena drůbeže, a hospodářských zvířat obecně, mohou být přínosné z hlediska nalezení některých alel genů, které nejsou z různých příčin přítomny u stávajících produkčních plemen. Imunitní systém je jedním z těch, kde by definování, např. nových alel poskytujících odolnost k některým nemocem, mohlo mít i praktický význam.

Je však třeba mít na vědomí, že teoretický i praktický dopad takto získaných experimentálních výsledků má jiný rozměr než studie u geneticky definovaných zvířecích modelů.

Místo opakovaných zmínek, že „výzkum byl bohužel většinou prováděn na inbredních liniích slepic“, bych naopak zdůraznil, že bohudík dlouholetému usilí s jejich vytvořením, bylo možné stanovit základní strukturu imunologicky významných molekul, zejména prototypu ptačího MHC u kura. S tím bylo spojené také objasnění některých imunologických mechanismů rezistence k nádorovým onemocněním. Zároveň bylo možné, opět díky těmto modelům, např. predikovat specifickou odpověď na vakcinaci vybranými antigeny patogenů jako je MDV nebo IBDV.

Součástí rešerže předložené práce by nepochybně měl být přehled alespoň některých nejdůležitějších prací u inbredních linií slepic, které položily základy ptačí imunologie. Jistě by také stálo za zmínku, že jedna z vůbec prvně popsaných asociací určité alely MHC a rezistence k virem indukovanému onemocnění byla popsána u kura – konkrétně se jedná o MHC(B) haplotyp B21 a MDV. Vzhledem k předpokládanému významu polymorfních systémů pro často diskutované evoluční soutěžení mezi hostitelem a parazitem, bylo překvapující, že neexistuje u známých savčích MHC mnoho takových příkladů.

U různých druhů hospodářských zvířat včetně drůbeže dochází pravidelně k jednostrannému šlechtění na „extrémní“ užitkovost. Často se v této souvislosti setkáváme s tzv. „přešlechtěností“, která se mimo jiné projevuje ztrátou odolnosti vůči patogenním agens i jiným vlivům prostředí. Obecně ztrátou fitness. Často se uvažovalo v této souvislosti s přikřížením některých původních plemen. To ale automaticky vede k zprůměrování sledovaného užitkového znaku. Obecně je odolnost původních plemen spíše polygenního charakteru a hledání tzv. „master“ genů rezistence v různých selekčních a hybridizačních programech není jednoduchá. Mimochodem, často se nakonec potvrdí rozhodující vliv MHC haplotypů segregujících v populaci.

Současné možnosti editování genomu pomocí CRISPR/Cas technologií otevírá nové možnosti. V tomto světle může být přínosné hledat nové varianty genů odpovědných za imunologickou odpověď k vybraným patogenům, či specifických receptorových molekul, u

panelu primitivních plemen, nebo i příbuzných divokých druhů. Opět si dovoluji připomenout, že dobrým východiskem pro hledání takových genů a jejich produktů na molekulární úrovni jsou jejich prototypy, jejichž struktura byla objasněna u laboratorních linií.

Předložená disertační práce se opírá o výsledky tří článků publikovaných (případně připravených k publikaci – III) v impaktovaných časopisech oborového významu. Některé úvahy týkající se popisu variací v relativním zastoupení různých typů buněk imunitního systému v krevním řečišti a jeho vztahu k zánětlivé odpovědi vycházejí z výsledků u zebřičky (*Taeniopygia guttata*). Ta to práce je velmi zajímavá, ale je otázkou do jaké míry jsou tyto výsledky relevantní pro situaci u plemen kura studovaných v dalších částech disertace. Až se to na první pohled nezdá, jsou ptáci ve světle recentních molekulárně genetických analýz poměrně heterogenní skupina a dělení na *Galloanserae* a *Neoaves* je jedním s nejlépe podporovaných. Je známo (v obráceném pořadí), že některá zobecnění pro ptáky, odvozená ze studia u kura, neplatí zejména pro pěvce – např. organizace MHC antigenů II. třídy. Dovolil bych si také připomenout, že odpověď na *in vivo* stimulaci PHA nebo tuberkulinovým antigenem (PPD) byla podrobně studována koncem 70-tých let na panelu inbredních linií slepic, kde byly zjištěny významné meziliniové rozdíly podmíněné genotypem MHC.

Jak autorka sama uvádí, u zebřičky není dostupný panel protilátek proti antigenům lymfoidních buněk, což samozřejmě limituje definici příslušných subpopulací. To bylo dlouho i nevýhodou kuřecího modelu ve srovnání např. s myší. V současné době je ale dostupná dostatečná paleta monoklonálních protilátek, včetně anti CD4 a CD8, které charakterizují základní dělení T- lymfocytů na pomocné (CD4+) a cytotoxické/tlumivé (CD8+). V minulosti již byly pomocí těchto protilátek popsány u kuřat meziliniové rozdíly v poměru CD4+/CD8+ lymfocytů separovaných z krve. Typicky u linie s vysokou odpovědí na určitý viróvý antigen je tento poměr 3: 1, zatímco u linie s nízkou odpovědí je to 1: 1. Možná je tedy škoda, že se autorka v práci týkající se plemen drůbeže, nezaměřila také na podrobnější charakterizaci subpopulací T- lymfocytů. V této souvislosti ještě připomínám, že uváděná interpretace celkového zvýšení CD4+ lymfocytů u určitého plemene jen ve směru k pravděpodobně vysoké produkci protilátek je poněkud zjednodušená – CD4+ T- lymfocyty mají centrální úlohu v mnoha imunologických interakcích, včetně stimulace buňkami zprostředkované imunity.

Ještě malá poznámka k výběru ptačích modelů. Samozřejmě, hledání variant důležitých - šlechtěním ztracených – genů u původních plemen, je adekvátní přístup. Zde se také otvírá možnost *in vivo* pokusů na přiměřeném počtu zvířat. Možná by ale v budoucnu stálo zato vypravit se za nějakými příbuznějšími ptáky než jsou zebřičky – např. bažanty, kteří jsou v široké škále druhů dostupní v soukromých chovech. Naše zkušenosti s analýzou receptoru pro podskupinu J ptačích leukozových virů ukazují, že příslušná varianta tohoto genu poskytující rezistenci nemusí být přítomna ani v rozsáhlém panelu plemen kura, a lze ji najít až u příbuzných galliformních druhů.

Velmi zajímavé a z mého pohledu konzistentní výsledky přináší autorčina práce III. Jenom malou poznámku: na str. 31 je uvedeno, že byla v bílku použitých vajíček detegována malá množství proteinů ptačích leukozových virů (ALV). Vzhledem k malému množství se autoři

s tímto faktem dále nezabývali a není zde ani zmínka o jaké virové produkty šlo. Osobně si nemyslím, že by kontaminace ALV byla bezvýznamná, a to jak z hlediska definování experimentálního pozadí, tak z obecného hlediska pro kvalitu, zvláště násadových vajec. Velká pozornost je v poslední době věnována především nově objeveným ALV virům podskupiny J, u nichž zřejmě dochází k rychlé evoluci nových variant s rozšířeným spektrem patogenního působení.

Autor ky bych se rád zeptal:

- 1) Je imunitní systém ptáků významně odlišný od savců. V čem spočívají případné odlišnosti a jaký je jejich obecný význam pro studium imunologických funkcí.
- 2) Mohla byste odhadnout, které variantní geny by byly vhodné pro případný knock in u komerční drůbeže a nastínit stručně příslušnou strategii.
- 3) Prosil bych o krátký komentář k evolučním vztahům v rámci ptáků a zda nebylo možno použít pro srovnávací analýzu některý z blízkých druhů z řádu *Galliformes*.

Závěrem konstatuji, že předložená disertační práce splňuje požadavky pro udělení titulu Ph.D.

Ing. Jiří Plachý, CSc