

Oponentský posudek na diplomovou práci Evy Krkavcové

„Funkce antimikrobiálních proteinů v bílku u prekociálních ptáků“

Oponování diplomové práce Evy Krkavcové pro mne bylo velmi příjemným úkolem. Práce je psaná živým, kultivovaným a i ve složitějších pasážích srozumitelným jazykem, obsahuje jen minimum překlepů či jiných formálních nedostatků. Po výborně napsaném úvodu jsou popsány průkopnické experimenty snažící se poodhalit funkci tří proteinů s antimikrobiální funkcí (avidinu, lysozymu a ovotransferinu) v bílku dvou druhů prekociálních ptáků. Objem experimentální práce je úctyhodný, každý protein byl vyhodnocován jinou metodou, navíc byl proveden odhad intenzity bakteriální infekce pomocí RT-PCR a antimikrobiální aktivity komplementu krevní plazmy mláďat, o práci s vejci a ptáky zahrnující opakovaná měření ani nemluvě. Experimenty jsou pečlivě připraveny, vzorně statisticky vyhodnoceny a velmi rozumně a opatrně interpretovány. Celý monumentální dojem z práce kazí jen poněkud nedotažená diskuse – ne že by obsahovala něco, s čím bych zásadně nesouhlasil a je psaná také zajímavě, přesto však by si takový objem experimentální práce a výsledků vybízející k množství úvah zasloužil podrobnější rozbor než pouhých necelých 7 stran. Chápu, že pionýři to mají těžké a jen těžko se diskutuje se z větší části neexistujícími pracemi. Přesto tato jistá nedotaženost diskuse kontrastuje s vymazlenými jinými částmi práce. Práci celkově hodnotím jednoznačně velmi vysoce a nepochybuji o jejím kladném přijetí.

Mám několik podnětů k uspořádání experimentů a k interpretacím:

- 1) Byla zjišťována opakovatelnost analýz koncentrací antimikrobiálních proteinů, což je skvělé, korelační koeficient pro ovotransferin je sice průkazný, ale překvapivě malý (0.28, str. 22). Pokud se nejedná o překlep, čím si to můžeme vysvětlit a máme tedy výsledkům u ovotransferinu věřit?
- 2) Imunitní funkce komplementu byla měřena na jediné bakterii, kterou můžeme s trochou dobré vůle považovat za nespecifického patogena. Tento způsob odhadu imunitní funkce mně přijde velmi umělé a zajímalo by mě, nakolik může odrážet opravdovou odolnost vůči infekci. Co si o tom autorka myslí?
- 3) Z grafů zobrazujících růstové křivky křepelek je jasné, že jsou docela pohlavně dimorfní. Proto mne překvapuje, že faktor „pohlaví mláďete“ nebyl zařazen do ani jedné z analýz. Přitom může značně zkreslit snad všechny sledované a vyhodnocované parametry. Manipulace navíc může mít pohlavně specifický vliv.
- 4) Proč nebyl v designu experimentů ošetřen vliv matky? Šlo například rozdělit vejce jedné samice do více treatmentů (to bych viděl raději než pozdější statistické ošetření). Či pocházelo každé vejce od jedné samice?

5) Do manipulačních experimentů by měla být ideálně zavedena i čistá kontrola (tj. vejce bez přidání PBS), umožnila by odhadnout vliv otevření vejce a vpravení roztoku.

6) Chápu náročnost manipulativních experimentů, přesto je škoda, že byla aplikována jen jedna dávka proteinů. Otestování dalších dávek (třeba i nefyziologických) by mohlo přinést další vhled do funkcí studovaných proteinů a mohlo by snáze odhalit jejich potenciální efekty na fenotyp (ty většinou v experimentech nebyly nalezeny, což může být způsobeno právě relativně nízkými aplikovanými dávkami).

7) Překvapila mně relativně nízká celková líhivost vajec (str. 31) – ta mohla mít také význam pro malou pravděpodobnost nalezení efektů na fenotyp mláďat.

8) V korelační studii u kachen vyšlo statisticky průkazné společné působení antimikrobiálních proteinů (nedokážu posoudit, zda je použití Z-skóru naprosto správné, ale připadá mně rozumné) na úspěšnost líhnutí a na snížení rizika bakteriální infekce, ale vliv mikrobiální infekce na úspěšnost líhnutí byl neprůkazný, co hůř, takřka nulový. Autorka to interpretuje tak, že studované proteiny mají tedy pravděpodobně i jinou než antimikrobiální funkci. Je to možné, spíš se ale obávám, že tento výsledek příliš nenasvědčuje robustnosti výsledků.

9) V diskusi (str. 42) mne překvapuje dost odvážné tvrzení, že výsledky nepotvrzují závěry studií, že rychlost růstu mláďat může být ovlivněna maternální depozicí biologicky aktivních látek – jsou uvedeny příklady androgenů. Ty ale zcela jistě vliv mají.

10) Autorka se zabývala maternálně alokovanými steroidy do vajec už v bakalářské práci, proto bych od ní nečekal tak zjednodušující tvrzení, že androgeny mají vliv na imunitu mláďat kvůli pozitivnímu vlivu na růst a rychlost metabolismu.

11) V diskusi autorka uvádí svou hypotézu, že experimentálně zvýšený obsah antimikrobiálních proteinů by mohl vést ke zpomalenému vývinu kvůli potlačení trávících bakterií v pozdní fázi embryogeneze ptáka. Myslím, že je velmi pravděpodobné, že střevní mikroflóra se do velké míry ustanovuje až po vylíhnutí a že trávící trakt má pro příjem živin během embryogeneze minimální roli.

12) Vůbec mně přijde divné, že by antimikrobiální proteiny zpomalovaly ontogenetický vývin. Jak si autorka takový účinek představuje? Jaké morfo-genetické procesy by měly být takto zpomaleny? Z práce a statistického vyhodnocení se čtenář nemá šanci dozvědět, jaké je skutečné zdržení velkých vajec s experimentálně zvýšeným obsahem proteinů a lze tedy nesnadno posoudit, o jak velký efekt se jedná (z obrázků soudím, že nevelký). Myslím, že delší doba inkubace by mohla spíš být přisouzena delším pobytem mláďat ve vejci. Mláďata ptáků i plazů se rozhodují, kdy se mají začít líhnout, a lze předpokládat, že mláďatům se z kvalitnějšího vejce nebude chtít ven (mají zde např. dostatek živin, zahřívá je matka...). Zdržení může odrážet pozitivní, ne automaticky předpokládaný negativní vliv na zdatnost.

13) U kachen i křepelk je jistě tlak na synchronní líhnutí. Líhnutí bude synchronizováno vokalizací matky, ale jistě i mláďaty mezi sebou. Je možné, že tento efekt v inkubátoru ovlivnil výsledky o načasování líhnutí?

Na závěr opakuji, že diplomová práce je velmi kvalitní, popisuje značné množství výborně odvedené práce, je celkově dobře napsaná a bez váhání ji doporučuji k obhajobě a ke klasifikaci výborně.

V Praze 13. září 2012

doc. Mgr. Lukáš Kratochvíl, PhD.

katedra ekologie PŘF UK