POSUDEK K DIPLOMOVÉ PRÁCI

NÁZEV PRÁCE:

Interakce vajíček a miracidií *Trichobilharzia regenti* s nosní sliznicí kachen
(Interactions of the eggs and miracidia of *Trichobilharzia regenti* with the duck nasal mucosa)

AUTOR PRÁCE:
Bc. Linda Vlčková
Katedra Parazitologie, PřF UK v Praze

OPONENT:
Mgr. Marta Chanová, Ph.D.
Ústav imunologie a mikrobiologie, 1. LF UK a VFN v Praze

Předložená diplomová práce (DP) má 105 stran a je členěna dle zvyklostí (Úvod, Cíle DP, Literární přehled, Metodika, Výsledky, Diskuze, Závěr, Seznam použitých zkratek, Literatura). V textu se nevyskytují gramatické ani stylistické chyby, text je doplněn početnými mikrofotografiemi, 9 tabulkami a 2 grafy. Práce splňuje formální požadavky kladené na DP.

Stanoveným cílem DP bylo charakterizovat patogenezi a změny v imunitní odpovědi v nosní sliznici kachen nakažených ptačí schistosomou *Trichobilharzia regenti* od 14. do 26. dne po infekci, a to s využitím klasických histologických barvení, imunohistochemických značení a histochemických značení lektíny.

Kapitola „LITERÁRNÍ PŘEHLED“ shrnuje informace o interakcích lidských i ptačích schistosom s hostitelem. Autorka v ní blíže popisuje imunitní reakce probíhající v různých fázích infekce a zvlášť se věnuje interakcím parazita se sliznicemi hostitele. Dále také poskytuje přehled specifik kachního imunitního systému a obranných mechanismů uplatňovaných vůči patogenům.

Kapitola je psaná přehledně, rozsah použitých zdrojů informací odpovídá tématu, zdroje byly voleny vhodně a citovány správně. Občas jsou ale informace nekriticky přebrané jenom z jediného zdroje, a pokud se informace z různých zdrojů rozcházejí, není toto diskutováno. Navíc, při použití rozcházejících se zdrojů v různých částech práce pak dochází k rozporům (př. s. 13 - "žádné poškození ani červi nebyli zaznamenány v *bulbus olfactorius* ..." a s. 15 - "V oblasti *bulbus olfactorius* se kolem parazita vyskytovali infiltráty..."). Celkově ale kapitola poskytuje kvalitní teoretický základ k danému tématu.

Kapitola „METODIKA“ je logicky a přehledně členěna do podkapitol několika úrovní. V rámci jednotlivých podkapitol je text místy uspořádán pro čtenáře nepohodlně, když kroky nebo informace k nim nejsou popisovány v pořadí, v jakém nenásledují. Všechny potřebné informace jsou ale v dalším textu většinou objasněny. Výjimku tvoří několik informací, které ve výčtu použitých metod zcela chybí. V textu není nijak popsán původ nebo způsob získání krevních roztěrů, otisků sleziny a Fabriciovy burzy, chybí i informace o metodě montování nabarvených histologických preparátů po jejich odvodnění. U mnohých použitých primárních

protilátek (15 z 31) není uveden výrobce ani katalogové číslo, u dalších 4 je uveden jen výrobce (s. 40, tab. 2). U všech těchto protilátek je uveden jenom tzv. "původ", a to instituce (nejčastěji ÚMG AV). Není jasné, zda se jedná o protilátku připravenou na daném pracovišti po imunizaci zvířat, každopádně v tom případě chybí bližší informace o postupu, použitém antigenu atd. Až podle kapitoly "Diskuze" se lze domnívat, že se pravděpodobně jedná o komerční protilátky poskytnuté ze zásob daných institucí, ale bez potřebné specifikace.

Jednotlivé postupy jsou přehledně popsány v krocích. Časté poznámky o možných obměnách či potřebě optimalizace (např. s. 30 - "barvení 30 s až 2 min., dle stáří roztoku a zalévacího média; s. 33 - "poté je možné dobarvit Mayerovym či Harrisovym hematoxylinem", apod.) však budí dojem, že se nejedná o přesný popis konkrétních kroků provedených autorkou, ale o přebraný obecný text protokolu. Navíc, mnohé z kroků jsou rozsáhle komentovány, čím se kapitola "METODIKA" často stává diskusí o metodách (př. s. 32 - "...byla většinou doporučována jádrová červeň..., my jsme použili Weigertův hematoxylin."; nebo "Bylo použito komerčně dostupné Schiffovo činidlo, lze jej však také připravit následovně: ...(postup)..., má mít čirou barvu..., skladování je doporučeno v lednici.").

Celkově bylo na histologické řezy aplikováno 11 různých barvení, 31 primárních protilátek a 8 lektinů. Některá barvení byly zvoleny pro daný účel netypicky, např. barvení Giemsa (ve dvou modifikacích), používané standardně pro roztěrové preparáty nebo Ziehl - Neelsen, používané standardně pro průkaz acidorezistentních bakterií. Není zřejmé, na základě čeho byly pro práci zvoleny některé protilátky, které dle literatury a tabulky 2 neznačí žádné kachní buňky, nebo protilátky, kterých reaktivita s kachními buňkami nebyla ověřena a jiná protilátka s požadovanou specifitou byla k dispozici.

Kromě zpracování histologických řezů byla využita i průtoková cytometrie. Touto metodou byla testována reaktivita některých z použitých protilátek s kachními buňkami, ale neposkytla požadovaný výsledek. Informace uvedené v dalších kapitolách ("VÝSLEDKY", "DISKUZE") popisující při měření na cytometru vysoký podíl mrtvých buněk a buněčného debris, a nízký celkový počet naměřených událostí, svědčí o chybě ve zpracování. Zjištění, že převažující erytrocyty v plné krvi znemožňují detekci jiných, málo početných buněčných populací, naznačuje spíš nepromyšlení experimentu před jeho provedením.

Kapitola "VÝSLEDKY" často obsahuje mimo nových zjištění i popis známých faktů, ty dokonce v některých částech převažují (př. podkapitola 3.1; 3.2.2.1, 3.2.2.2, atd). Kapitola je postupným popisem úspěšných i neúspěšných výsledků jednotlivých experimentů, autorka popisuje použitelnost jednotlivých metod, způsoby optimalizace, případné komplikace a chyby v postupech. Např. v podkapitole 3.2 (Histologické zhodnocení tkáně) autorka hodnotí použitá histologická barvení, popisuje vzhled jednotlivých struktur po jejich aplikaci a dochází k závěru, že barvení použitelná k histopatologickému hodnocení jsou HE, Massonovy trichromy a toluidínová modř. Následuje popis infikované sliznice (výskyt parazitů, míra poškození krevních cév i slizniční tkáně) ve čtyřech vybraných fázích po aplikaci těchto barvení. V závěru podkapitoly autorka shrnuje poznatky získané histologickými barveními. V následující podkapitole se autorka obdobně věnuje imunohistochemickému značení. Hodnotí nejprve použitelnost protilátek, dále popisuje tvar, početnost a lokalizaci fluorescenčně označených struktur při jejich aplikaci. Postrádám ale jakékoli propojení výsledků získaných po zpracování stejné tkáně oběma metodami (pomocí barvení a IHC značení). Použitelnost lektinů pro identifikaci imunitních buněk a tím pro hodnocení průběhu infekce nebyla prokázána (3.5).

V kapitole "DISKUZE" autorka postupně komentuje výsledky získané jednotlivými metodami, případně komentuje komplikace u jednotlivých experimentů. Jednotlivé informace jsou přehledně a srozumitelně diskutovány porovnáváním s vhodně zvolenými literárními zdroji. V textu jsou vysvětleny i příčiny některých nezdarů. Často přitom šlo o nezdary, kterým by se předešlo lepší znalostí literatury nebo důkladnějším plánováním experimentů (např. při řešení problémů s autofluorescencí mohlo být přehodnoceno, jestli nebude vhodnější použít chromogenní značení, s. 83, nebo uskladněním alikvotních dávek protilátek se mohlo předejít jejich znehodnocení, s. 84).

Jednotlivé kapitoly jsou doplněny obrázky, tabulkami a grafy. Na tyto je v textu správně odkazováno, a s výjimkou několika tabulek jsou správně a srozumitelně popsané. Některé tabulky nejsou jasně pochopitelné bez dohledání informací v textu, např. tab. 5.

Závěr práce sumarizuje popsané výsledky a rozděluje je na fakty, které byly prací ověřeny či potvrzeny, a na fakty zcela nově popsané.

Poznámky:

1. s. 70, obr. 18: Buňky můžeme popisovat jako "pozitivní pro daný znak", ale ne jako "pozitivní na protilátku proti danému znaku"

2. s. 77: Pokud na histologickém preparátu není možné jasně rozlišit jednotlivé buňky kvůli větší tloušťce řezu, je vhodné připravit řezy tenčí, ideálně 2µm.

3. s. 76: Pravděpodobnější jako narušení cév dospělými červy je jejich narušení nakladenými vajíčky a / nebo imunitní reakcí.

Celkové hodnocení:

Přes veškeré výhrady práci doporučuji k obhajobě.

Otázky k diskuzi:

1. Vysvětlete v stručnosti, na základě čeho jste volili jednotlivá barvení, protilátky a lektíny.

2. U IHC značení popisujete značné problémy s autofluorescencí, s nereprodukovatelností výsledků, apod. Popište, jak jste postupovali při optimalizaci těchto metod.

3. Vysvětlete, co je molekula KUL01, kde je její výskyt dle literatury znám, kde jste ji očekávali u kachen, a jak se od očekávání liší vaše výsledky.

10. září 2018

Mgr. Marta Chanová, Ph.D.