

## Oponentský posudek dizertační práce Mgr. Jany Bulantové

Název dizertační práce: **Vývoj povrchu a tělní svaloviny u ptačí schistosomy *Trichobilharzia regenti***

Název dizertační práce v angličtině: **Development of surface and body musculature of the bird schistosome *Trichobilharzia regenti***

Dizertační práce Mgr. Jany Bulantové se zabývá studiem jednotlivých stádií schistosomy *Trichobilharzia regenti* se zaměřením na změny v jejich povrchové struktuře a vývoj tělní svaloviny. Téma práce je velmi aktuální vzhledem k tomu, že *T. regenti* je původcem cercáriové dermatitidy a že tento parazit je rozšířen v mnoha částech Evropy. Práce je napsána v anglickém jazyce a dodržuje tradiční strukturu. Úvod, který má skoro 40 stran, přináší přehled dosavadních výsledků výzkumu životního cyklu *T. regenti* a charakteristiku jednotlivých stádií. Po tomto úvodu následuje definování cílů práce. Výsledky jsou reprezentovány třemi publikacemi a celá práce je ukončena závěrečným výčtem nejdůležitějších poznatků. Práce je napsána srozumitelně, v textu se téměř nevyskytují formální překlepy. Navíc předložená práce působí i velmi pěkným grafickým dojmem, k čemuž přispívá značný počet kvalitních mikroskopických fotografií, které se v ní nacházejí.

V úvodním přehledu se autorka podrobně věnuje shrnutí dosud publikovaných údajů o vývoji povrchu a svaloviny u jednotlivých stádií *T. regenti*, porovnává je s jinými zástupci rodu *Trichobilharzia* a doplňuje je svými vlastními dosud nepublikovanými daty, zahrnujícími snímky z konfokálního, rastrovacího a transmisního elektronového mikroskopu. Bohužel ale v této části textu chybí popisy metod, které byly použity k přípravě preparátů pro elektronovou mikroskopii. V popisu snímků je uveden pouze obecně typ mikroskopu, na kterém byly snímky pořízeny. Například u snímku 2A na str. 18, na kterém je zachycen tvar vajíčka *T. regenti* a detail povrchu pomocí SEM, není možné zjistit, jakým způsobem byl vzorek připravován a tedy nakolik arteficiální je prezentovaná povrchová struktura mikrosponální vrstvy. Navíc u detailního zobrazení ve výřezu snímku chybí marker, který by čtenáři umožnil odhadnout zvětšení povrchové struktury. Dále u snímku není uvedeno, že byl počítačově upraven, což odhaduji na základě dokonalé černé pozadí. Tyto výhrady se týkají téměř všech snímků ze SEM uveřejněných na konci kapitol úvodní části práce. Stejně tak u snímků z TEM není uvedeno, jak byly vzorky připravovány. Vzhledem k tomu, že na některých snímcích jsou dokumentovány časově závislé děje (např. Fig.10B na str. 46), je

důležité uvést, jak byly vzorky fixovány. Tato část práce logicky vyústila ve stanovení cílů, které reflektují skutečnost, že v literatuře chybí kompletní údaje o ultrastruktuře povrchu, přítomnosti imunogenních molekul a vývoji svaloviny u jednotlivých stádií tohoto parazita.

Druhá část práce obsahuje tři články, které spojuje tematika studia schistosomy *T. regenti*. V prvním článku je popsána metoda kultivace ptačích schistosom včetně *T. regenti* bez použití experimentálních zvířat v médiu s přídavkem kachních krevních buněk a homogenizované nervové tkáně. Tato metoda přináší možnost získat větší množství raných stádií parazita, které mohou být použity k jeho dalšímu výzkumu. V druhém článku je hlavní pozornost věnována vývoji svaloviny *T. regenti* od stádia miracidium do stádia dospělého červa. Svalovina u jednotlivých stádií značená FITC byla pozorována v konfokálním mikroskopu a pomocí transmisní elektronové mikroskopie bylo ukázáno ve vybraných případech i její uspořádání na ultrastrukturální úrovni. Třetí článek se zabývá lokalizací hlavních antigenů *T. regenti*. Pomocí imunofluorescenční mikroskopie a imunolokalizace na ultrastrukturální úrovni v TEM byla prokázána přítomnost imunogenních molekul v různých tělískách, která byla vypouštěna z prostoru subtegumentálních buněk cercárií, schistosomul a dospělců do tegumentu. V závěru práce autorka na dvou stránkách shrnuje získané výsledky a v krátkých odstavcích pak zdůrazňuje nejdůležitější zjištění rozdělené do tří kategorií, odpovídajících zaměření jednotlivých článků. Celkově mohu konstatovat, že práce přinesla řadu nových poznatků jak v oblasti vývoje, uspořádání a funkce svalů u jednotlivých stádií schistosom, např. proces přeměny hlavového orgánu cercárií na ústní přísavku schistosomul. tak i při lokalizaci antigenních struktur u *T. regenti*.

Závěrem mám k práci Mgr. Bulantové několik dotazů:

1/ Pro studium vývoje svaloviny u jednotlivých stádií *T. regenti* je ideálním nástrojem z mého pohledu korelační světelná a elektronová mikroskopie, která by umožnila zobrazit konkrétní místa vybraná pomocí konfokální mikroskopie na ultrastrukturální úrovni. Bylo o využití této metody uvažováno?

2/ Kryofixace pomocí vysokotlakého zamrazování následovaná mrazovou substitucí byla v práci použita jenom v případě imunolokalizace antigenních struktur pomocí TEM. Tato metoda je považována za nejlepší i pro ultrastrukturální studie. Zvláště v případě vzorků, do kterých špatně penetrují chemická činidla, jako je tomu např. u vajíček či sporocyst studovaného červa. Zkoušela autorka práce tuto metodu použít? Pokud ano, do jaké míry se lišil ultrastrukturální vzhled daného vzorku od standardně připraveného pomocí chemických činidel?

3/ Jakou teplotu měl fixační roztok v případě fixace 3 hodiny staré schistosomuly pro pozorování jejího povrchu v SEM (postup přípravy uvedený v článku 1)? Opět prosím o komentář, zda by nebylo lepší použít v tomto případě mrazovou fixaci, která by jednak věrněji zachovala povrchové struktury a okamžitě fixovala daný vzorek, což by z hlediska sledování časové závislosti vývoje povrchových struktur bylo vhodnější.

**Závěr:** Stanovené cíle disertační práce Mgr. Jany Bulantové byly splněny. Získané výsledky byly zpracovány do tří publikací. V jedné z nich je Mgr. Jana Bulantová první autorkou, ve zbývajících dvou je členem autorského kolektivu. K získání výsledků byly použity technicky náročné postupy zahrnující konfokální a elektronovou mikroskopii. Výsledky obsažené v dizertaci přináší řadu nových poznatků o vývoji jednotlivých stádií *T.regenti*. Touto prací Mgr. Bulantová jasně prokázala schopnost samostatné vědecké práce.

V případě zdařilé obhajoby dizertace, práci Mgr. Jany Bulantové doporučuji k dalšímu řízení pro udělení titulu PhD. dle platných předpisů.

V Českých Budějovicích, 28. 11. 2012



Ing. Jana Nebesářová, CSc.  
Laboratoř elektronové mikroskopie  
Biologické centrum AV ČR, v.v.i - Parazitologický ústav  
Branišovská 31  
370 05 České Budějovice  
Telefon: 387775402  
E-mail: nebe@paru.cas.cz