

Oponentský posudek na diplomovou práci

Diplomová práce: **Cerebrální toxokaróza u myší**

Autor: **Nikol Bernardová**

Předložené diplomové práce je zaměřena na charakterizaci cerebrální formy toxokarózy u myší v různých fázích infekce. Autorka si kladla za cíl sledovat počet a lokalizaci larev v mozku, zjistit histopatologické změny v infikované nervové tkáni a zaznamenat případné následné neurologické projevy infekce a změny v chování u nakažených myší. Tyto stanovené cíle byly splněny. Nicméně k obsahu diplomové práce mám řadu výhrad.

Diplomová práce je členěna na kapitoly Úvod, Literární přehled, Cíle práce, Metodika, Výsledky, Diskuze, Závěr. Tyto kapitoly jsou dále přehledně členěny na další podkapitoly. Práce zahrnuje 73 stran, z toho 53 stran vlastního textu, který je psán vcelku dobrou češtinou. Jsou zde ovšem některé slovní obraty, které by bylo vhodné nahradit jinými, jako např. místo zápalová reakce se více používá zánětlivá reakce, místo načepýřená srst naježená srst. Text je většinou plynulý, ale nacházejí se zde i méně pochopitelné až nesmyslné pasáže, jako např. na str. 26 odstavec mezi tabulkami č.2 a č.3.

Přehled použité literatury zahrnuje 81 citací z toho je šestkrát citováno review a jednou osobní sdělení.

Literární přehled se věnuje převážně biologii druhu *Toxocara canis* a popisu larvální toxokarózy. Chybí zde nějaká zmínka o tom, co je známo o produkci protilátek v průběhu této infekce.

Kapitola o metodice obsahuje podrobný popis použitých metod. Z mého pohledu je popis běžně používaných metod zbytečně podrobný. Obsah některých odstavců se opakuje i v následujících odrážkách. Naopak zde chybí tabulka s intervaly pitev/vyšetření a počty myší usmrcených v jednotlivých intervalech. Tabulka by velmi usnadnila orientaci v rozvržení pokusu. Dále z textu není zcela jasné, kolik zdravých myší bylo použito jako negativní kontrola.

V následující kapitole autorka shrnuje získané výsledky. Výsledky jsou prezentovány i pomocí 7 tabulek, 11 grafů a 3 obrázků. Bohužel popisky těchto tabulek a grafů nejsou dostatečné. Čtenář se nedočte, co představuje každý řádek v tabulce/sloupec v grafu. Může se jen domnívat, že každý řádek/sloupec obsahuje údaje o jedné myši. Pokud tomu tak je, tak již v první tabulce je nesoulad v počtech myší. V metodice je uvedeno, že v první skupině bylo 33 myší s jednorázovou infekcí. V tabulce č. 1, která shrnuje neurologické příznaky myší s jednorázovou infekcí, je pouze 25 případů/myší. Nikde není napsáno, co se stalo se zbylými osmi jedinci. Dále graf č. 1, který zobrazuje nárůst hladiny protilátek u myší s jednorázovou infekcí, obsahuje 21 sloupců (zřejmě představujících 21 myší). Opět čtenář neví, proč zde není hodnoceno sérum i ze zbylých 12 myší. Tento nesoulad je i u dalších tabulek a grafů a vyskytuje se i v případě reinfekcí. V grafech zobrazujících výsledky z reinfekcí nejsou od sebe odlišeny myši s časnou a pozdní reinfekcí. Z textu není zřejmé, proč bylo na roztakovou/trávicí metodu pro detekci počtu larev v mozku použito pouze 8 myší s jednorázovou infekcí. Z toho na mozky ze dvou jedinců byla použita trávicí metoda, která se ukázala jako nevhodná. Podle mého názoru hodnocení tendence k hromadění larev v mozku pouze na základě výsledků ze šesti myší nemá příliš velkou vypovídací hodnotu.

Výsledky jsou v příloze doplněny 13 mikroskopickými fotografiemi. Fotografie bohužel nejsou v příliš dobré kvalitě a u všech snímků postrádám měřítko. Na obr. č. 4 nelze při dané kvalitě rozlišit, zda se jedná o průřez cévou, jak autorka uvádí, nebo průřez červem. V popiscích obrázků č. 5 a 6 autorka tvrdí, že šipky ukazují na infiltrát (zřejmě zánětlivých buněk, to není uvedeno) kolem cévy. Podle mého názoru se v obou případech jedná o buňky stěny cévy. Mírná infiltrace zánětlivými buňkami se dá vidět pouze na obrázku č. 7. Příliš nesouhlasím ani s interpretací obrázku č. 13, kde je podle autorky buňka (to, že se jedná o nervovou buňku, v popisku chybí) s kondenzovaným chromatinem. Autorka píše v kapitole Výsledky na str. 40, že by se mohlo jednat o začínající pyknózu jádra. S touto interpretací bych byla opatrná. Mě se uvedená nervová buňka jeví jako zdravá. Na detekci poškození neuronů a jejich axonů je vhodné použít specifické protilátky jako např. anti- β amyloid precursor protein (β -APP).

V kapitole Diskuze autorka na 10 stranách vysvětluje použité postupy a časové rozložení experimentu, probírá výsledky svého pokusu a srovnává je se zahraniční literaturou. I k této kapitole mám několik poznámek. Chybí mi zde srovnání s infekcemi jinými neurotropními helminty. Diskuze se věnuje pouze toxokaróze. V některých případech se autorka uchyluje ke spekulacím, které nejsou podloženy vlastními výsledky ani relevantní literaturou (např. str. 50, 3. odstavec). V textu jsem narazila na určité nejasnosti a zřejmě špatná vyjádření. Jako např. v posledním odstavci na str. 48: Optická kontrola a měření čerstvě vyjmutých jater a sleziny odhalila případné makroskopické patologické problémy myši způsobené migrací larev tělem. Z této věty není jasné, co tím autorka myslela. Na str. 50 autorka píše: „Dle výsledků, které ukazují, že počet larev v mozcích myši s reinfekcí byl po stejně dlouhé době po infekci více než dvojnásobný v porovnání s počty larev z mozků myši s jednorázovou infekcí ...“ Není zde zcela zřejmé, zda tím autorka myslí výsledky Kolbekové *et al.* (2011b) nebo své výsledky. Detekce počtu larev po reinfekci myši není v kapitole Výsledky uvedena.

V kapitole Závěr jsou shrnuty získané výsledky. V poslední větě autorka píše, že je potřeba proniknout do hloubky této problematiky. Zde by se hodilo nastínit další možné postupy při studiu tohoto problému.

K předložené práci bych měla ještě několik kritických poznámek týkajících se především metodiky. Ač autorka uvedla důvod, proč nebyla provedena perfuze myši před pitvou, myslím si, že perfuze měla být provedena. V nervové tkáni dochází k rychlým post mortálním změnám. Bez provedení fixace, optimálně paraformaldehydem, ihned po celkovém vykrvení myši mohou být tyto změny chybně považovány za poškození způsobené přítomností parazita. Dále v této práci postrádám alespoň jednoduché statistické zhodnocení získaných výsledků.

Dotazy:

- 1) Píšete, že jste chtěla ověřit, zda přítomnost neurologických příznaků mohla souviset se změnami hladin protilátek v séru infikovaných myši. Očekávala jste, že by tomu tak mohlo být? Jsou o tom nějaké zmínky v literatuře?
- 2) V metodice uvádíte různá ředění sér (1:100 a 1:200) testovaných v ELISA reakci. Proč tomu tak bylo?
- 3) Schéma pokusů zahrnuje úctyhodných 36. týdnů, během kterých byla infikovaným myším průběžně odebírána krev pro detekci sérových protilátek. Proč tato séra nebyla použita pro detekci specifických IgG a hodnocení změny hladiny těchto protilátek v průběhu infekcí?

- 4) V kapitole 5.3.1.1 na str. 29 píšete: Granulomy, které sejevily jako drobné bílé noduly ve tkáni,... Podle čeho jste si jistá, že se jednalo o granulomy? Byla játra podrobena histologickému vyšetření?
- 5) Jedním z vašich výsledků je zajímavé zjištění, že larvy v mozku se nacházely ve shlucích převážně v oblasti *internale capsule*. Je z literatury znám výskyt v této oblasti i u jiných parazitů? Našla jste nějaké vysvětlení pro preferenci k této lokalizaci?
- 6) Pokud byste měla neomezené časové a finanční možnosti, jaké přístupy (metody) byste volila při studiu cerebrální toxokarózy?

Závěr:

Diplomová práce Nikol Bernardové přes veškeré připomínky splňuje požadavky kladené na diplomovou práci. Diplomovou práci hodnotím jako dobrou, v případě přesvědčivé obhajoby jako velmi dobrou.

V Praze dne 9. 9. 2016

RNDr. Lucie Panská, PhD