

Oponentský posudek
disertační práce na téma:
Vliv selenu na Lymfatický systém králíků

Autor: Ing. Roman Konečný

Školitel: prof. Ing. Jan Trávníček, CSc. JU České Budějovice, zemědělská fakulta, katedra veterinárních disciplin a kvality produktů

Školitel specialista: prof. MVDr. František Jelínek, CSc., Dipl. ECVP, Veterinární histopatologická laboratoř Praha

Oponent: prof. Ing. Bohuslav Čermák, CSc. Katedra genetiky, šlechtění a výživy zvířat, Zemědělská fakulta JU v Českých Budějovicích

Předložená disertační práce řeší aktuální téma. Zvolené téma práce napomáhá osvětlit mechanismus vlivu organicky vázaného selenu na problematiku jeho přenosu do orgánů u králíků, jako monitorovacích zvířat. Pozitivní působení selenu v doporučených dávkách bylo pokusně ověřováno. Nadlimitní dávkování může být spojeno s toxicitou tohoto prvku. Odstupňované dávky selenu v různé formě byly sledovány i z hlediska ovlivnění struktury lymfatických orgánů a dalších parametrů související s imunitním systémem králíků. V práci je prezentován anglický abstrakt, seznam zkratk používaných v práci a úvod.

Úvod

Je pojat trochu netradičně s citací literárních zkratk používaných v práci a úvod. Celá práce má 94 stran textu, dále 5 stran vložených barevných snímků histologických řezů (34 označených), 17 stran citací autorů. Dále je uvedeno na dvou stranách seznam 20ti tabulek, dále jedna strana seznamu grafů a jedna strana citací vlastní prací.

Literární přehled

Je sepsán na stranách 25ti stranách. Je členěn na dvě části. První se týká imunitního systému králíka a má 6 základních podkapitol (thymus, apendix, sacculum rotundus, mizní uzliny, slezina a lymfatická tkáň sliznic). Tato podkapitola je členěna ještě na 4 dílčí části (lymfatická tkáň gastrointestinálního traktu GALT, lymfatická tkáň dutiny nosní NALT, mandle, Lymfatická tkáň bronchů BALT. Druhá část se týká selenu a jeho biologických vlastností. Je členěna rovněž do 5ti subkapitol (selen, absorpce a metabolismus selenu, exkrece selenu, selenoproteiny, selen a imunitní systém. Tato subkapitola je dále členěna na 7 subkapitol (vliv selenu na funkci fagocytů, vliv selenu na lymfocyty, NK buňky a LAK buňky, vliv selenu na lymfatické orgány, vliv selenu na produkci protilátek, vztah selenu k zánětlivému procesu, vliv selenu na metabolity kyseliny arachidonové, vztah selenu k neplastickým procesům). Autor v seznamu literatury cituje 209 autorů a kolektivů. Někteří z nich nejsou použity v textu literárního přehledu, ani diskuse. Jedná se například: Bienenstock a Medermott(2005), Kiremidjian-Schumacher a Roy (1998), Powis, Mustacich a Coon(2000), Sitte, Huber, Grune, Landhoff, doecke, Von Zglinicki, Davis(2000), Spallholz (1997), Whanger (2001), , Wolfram, Arduser, Scharrer (1985).

Naopak v seznamu literatury postrádám citace Zákona o ochraně zvířat 77/2004 Sb.a prováděcí vyhlášky 207/2007 Sb. Stejně tak i citace použitých programů Statistika a ANOVA

Cíl práce je dělen na 6 dílčích cílů, které by měly naplnit členění literárního přehledu.

Histologické vyšetření lymfatických orgánů a tkání (mízní uzliny, Peyeroovy plaky, appendix, slezina, thymus).

Imunohistochemické vyšetření- průkaz CD 79+ buněk v lymfatických orgánech a tkáních

Sledování koncentrace selenu v krevním séru pokusných zvířat

Vyhodnocení vybraných krevních parametrů

Posouzení fagocytární aktivity neutrofilů

Vyhodnocení dalších souvisejících parametrů (hmotnost živých zvířat, relativní hmotnost sleziny).

Materiál a metody

Je uveden na 12 stranách se členěním na 7 subkapitol. Sedmá subkapitola je členěna na dalších 6 dílčích kapitol věnovaných zpracování biologického materiálu. Poslední šestá subkapitola je členěna na dalších 5 částí věnovaných histologickým a imunohistologickým metodám vyšetřování vzorků.

Byly provedeny dva experimenty po 3 skupinách zvířat po 6 kusech v trvání 9 týdnů. Odběry byly prováděny vždy na počátku, pak ve 4tém a 9tém týdnu pokusu. Průměrný věk králíků byl 7 měsíců a plemeno činčila velká. Pokusná skupina 1 v prvním pokuse byla negativní kontrola bez přidaného anorganického selenu 2. skupina dostávala 0,15 a třetí skupina 9 mg přidaného seleničitanu sodného na 1 kg sušiny. Ve druhém experimentu nebyla negativní kontrolní skupina. Obě první skupiny v prvním i druhém experimentu byly nejlehčí.

Přidávky Aminovitanu s rozdílným obsahem a formy selenu je uveden výrobce směsi TM-MsK1. Není uvedena vstupní analýza a forma granulí. Byly krmeny jen krmné směsi v obou experimentech?. V oddíle 4.5 je uveden obsah selenu v krmné směsi 0,17 mg/kg sušiny krmné směsi, ale v tabulce č 2 jsou hodnoty odlišné 0,15 mg./ kg sušiny.

V dalších částech jsou popisovány metody odběru krve, zpracování vzorků biologického materiálu. Jedná se o metody analýz krve, histologické vyšetření tkání a jejich hodnocení, imunohistochemické zpracování vzorků a statistické hodnocení výsledků.

Výsledky a diskuse

Tato kapitola je napsána na 48 stranách. Je členěna do 8 kapitol a člení se na další subkapitoly v kapitole 5,3 na 5,3,1 histologické nálezy v mízních uzlinách s opisem v krčních mízních uzlinách, popliteálních mízních uzlinách a mezenterálních mízních uzlinách. Dále pak na část 5,3,2, nálezy v Peyeroových placích. 5,3,3, appendixu, 5,3,4, ve slezině a 5,3,5 v thymu. Další kapitola 5,4, popisuje Imunohistochemické vyšetření věnuje se zjištěním CD79 v jednotlivých uzlinách a dalších částech.

Průměrné výsledky hmotností zvířat v prvním experimentu, jak je patrné z grafu č. 1 mají větší rozptyl než v experimentu 2 organická forma podávání selenu. Koncentrace selenu v krevním séru má nejvyšší hodnoty ve 3. skupině až 570 mg, v druhém pokuse 350 mg. Při polovičním dávkování.

Výsledky jednotlivých zjištění jsou uvedeny v přehledných tabulkách a vhodně doplněny grafy. Jsou z nich vytvořeny odpovídající podklady pro statistické hodnocení. Přínosem práce je doplnění o 34 barevných obrazových příloh histologických preparátů. Ty vhodně doplňují vlastní výsledky v předchozí kapitole výsledky. Možná že by měly být součástí vlastních výsledků a diskuse. K této části mám tyto připomínky: jsou dva pokusy

v popsaném uspořádání dostatečné? Při hodnocení tabulkových výsledků písmeny v případech, že ve sloupci jsou stejná čísla (0, nebo 6) jsou adekvátní? U fotografií je přínosné vyznačení hodnoceného detailu červenou šipkou. Škoda jen, že nejsou označeny i další detaily na snímcích.

Kapitola **Souhrn závěr** je sepsána na čtyřech stranách. V jednotlivých částech popisuje koncentraci selenu v krevním séru z čehož autor odvozuje významný závěr, že ke zvýšení došlo v prvních 4. týdnech aplikace. Při dalším přidávání k nárůstu již nedocházelo.

Živá hmotnost králíků se zvýšila ve všech skupinách. Při histologickém hodnocení stavby orgánů nebyly zjištěny patologické změny. Celkový počet leukocytů se pohyboval v rozmezí referenčních hodnot. Nebyl prokázán účinek různých forem dávek selenu na imunitní systém králíků.

Součástí je i návrh na další postup při plánování experimentů v této oblasti.

Vznesené připomínky a dotazy nesnižují výsledky uvedené v práci. Pro autora by spíše měly být návodem korekce při dalších publikacích vlastních výsledků. Při obhajobě by bylo vhodné, aby uchazeč odpověděl na tyto dotazy:

1. Vhodnost plánování suplementace krmných dávek selenem v různých formách
2. Je histologická dokumentace možná využít při průkaznosti výsledků,

Závěr

Ing. Roman Konečný prokázal schopnost samostatné vědecké práce, zhodnocením a interpretací výsledků chemických analýz, zpracování a vyhodnocení histologických preparátů. Přínosem je zpracování a barvení fotografií histologických preparátů.

K práci je přiložena citace autorových 5ti vědeckých publikací s IF, 3 odborných recenzovaných publikací a podíl na certifikované metodice.

Doporučuji, aby disertační práce Ing. Romana Konečného byla přijata k obhajobě a po úspěšném obhájení a vědecké rozpravě ve smyslu příslušných předpisů mu byl přiznán titul PH.D.

V Českých Budějovicích 4,12,2012



prof. Ing. Bohuslav Čermák, CSc.
Katedra genetiky, šlechtění a výživy zvířat
Zemědělská fakulta JU v Českých Budějovicích

Oponentský posudek na disertační práci Ing. Romana Konečného s názvem „Vliv selenu na lymfatický systém králíků“

Doktorská disertační práce pana Ing. Romana Konečného představuje ucelený vědecký spis čítající 141 stran včetně 20 tabulek, 14 grafů a 34 obrázků. Předložená práce byla vypracována na Katedře veterinárních disciplín a kvality produktů Zemědělské fakulty Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích.

Po obsahové a formální stránce má předložená disertační práce charakter fundovaného vědeckého díla. Práce je správně vertikálně členěna do obvyklých kapitol, jež jsou ještě dále tříděny do odpovídajících podkapitol logicky na sebe v průběhu celé práce navazujících. Jednotlivé kapitoly jsou vzájemně vyvážené, takže nedochází k jejich překrývání a zbytečnému opakování jednotlivých faktů. Celkové uspořádání práce příznivě ovlivňuje její přehlednost. Čtivost práce však v některých kapitolách není tak příkladná, mnohdy by bylo vhodnější používat více běžných českých výrazů než slov přejatých z jiných jazyků. Nicméně tato skutečnost nijak nesnižuje vysokou odbornou úroveň práce.

Stručně k jednotlivým kapitolám:

Literární přehled

Tato kapitola je velmi dobře zpracovanou rešerší, která obsahuje setříděné informace týkající se tématu práce. V této kapitole mě zaujala pasáž o vlivu selenu na fagocyty, lymfocyty, NK buňky atd. Chtěl bych se proto zeptat, zda se autor při studiu literatury setkal rovněž s informacemi o vlivu selenu na dendritické buňky? Dendritické buňky jsou v současné době velmi intenzivně studovanou populací buněk, možná by to byl i dobrý námět pro další studium, pokud se autor chce dále zabývat vlivem selenu na imunitní systém králíků.

Cíl práce

Cíl práce je velmi dobře formulovaný. Byla vymezena jasná hypotéza a dílčí cíle práce. Tato kapitola zcela splňuje svůj účel a oponent podle její formulace dokáže snadno ověřit, zda se autor drží navržených cílů a hypotézy.

Materiál a metodika

Tato kapitola je sepsána adekvátně k povaze předkládané práce. Oceňuji podrobný popis histologického a imunohistochemického vyšetření vzorků v podkapitole 4.7.6.

Jedinou nepřesností je odkazování na tabulku 1 v podkapitole 4.4 *Pokusná zvířata a ustájení*, ve skutečnosti autor odkazuje na tabulku 2, která je uvedena na straně 40.

Výsledky a diskuze

V této kapitole jsou velmi podrobně popsány výsledky, které jsou ihned konfrontovány s výsledky, kterých dosáhli jiní autoři. Velmi vhodně autor spojil kapitoly „výsledky“ a „diskuse“ do jedné kapitoly, což umožňuje větší přehlednost práce. Zároveň autor použil grafy přímo do textu, což rovněž umožňuje rychlou orientaci ve výsledcích. V textu jsou odkazy na obrázky, které tvoří fotografie mikroskopických preparátů, které byly

zpracovány na velmi vysoké úrovni. Obrazová dokumentace je jednou z nejsilnějších stránek práce.

Souhrn a závěr

Závěr práce odpovídá plně dosaženým výsledkům a zcela objektivně dokládá splnění cílů, které si autor kladl. I přes negativní nálezy v histologické stavbě lymfatických orgánů autor neklesá na mysli a zcela racionálně navrhuje další směr svého bádání, a to využití průtokové cytometrie pro studium buněčných populací imunitního systému králíků.

Seznam použité literatury

Autor použil 209 literárních zdrojů, z nichž zhruba polovina byla publikována v posledních 10 letech, což dokládá aktuálnost práce. Citovány jsou převážně zahraniční vědecké práce.

Dotazy:

1. V práci byla použita organická forma selenu v podobě selenizované řasy rodu *Chlorella*. Může tato řasa obsahovat také jiné komponenty, které by mohly výrazně ovlivnit buňky imunitního systému? Pokud ano, tak prosím uveďte nějaký konkrétní příklad.
2. Se zvyšující se dávkou organické formy selenu rostl výskyt CD79⁺ buněk v dómu Peyerových plaků. Mohl by autor objasnit, čím si tuto skutečnost vysvětluje?

Celkové hodnocení:

Jako oponent konstatuji, že disertační práce splňuje všechny požadavky kladené na tento druh vědeckého sdělení, a proto

doporučuji, aby byla přijata k obhajobě

v doktorském studijním programu Zootechnika, oboru Zoohygiena a prevence chorob hospodářských zvířat na Zemědělské fakultě Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích a aby panu

Ing. Romanu Konečnému

na základě její obhajoby byl udělen titul „doktor“ (Ph.D.).

V Brně, dne 3. 12. 2012



Ing. Petr Sláma, Ph.D.

Studijní oddělení
Zemědělská fakulta
Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Studentská 13
České Budějovice
37005

Oponentský posudek disertační práce

autor: **Ing. Roman Konečný**

název: **Vliv selenu na lymfatický systém králíků**

posudek vypracoval: **MVDr. Petr Fictum Ph.D., odborný asistent ústavu patologické morfologie a parazitologie FVL VFU Brno**

Studium vlivu selenu na řadu fyziologických a patofyziologických procesů v organismu u zvířat a studium patologických změn souvisejících s karencí nebo toxicitou selenu patří v dnešní době k stále aktuálním tématům. Proto každá práce, jejímž cílem je studium těchto metod je přínosem.

Předložená disertační práce představuje spis o 141 stránkách, členěný jako práce obdobného typu. Většinu disertační práce představuje vlastní práce, která je doložena 20 tabulkami, 14 grafy a 209 literárními citacemi. Součástí práce je rovněž obrazová fotodokumentace s 34 mikrofotografiemi.

Cílem předkládané práce bylo rozšíření poznatků o vlivu anorganické a organické formy selenu na strukturu lymfatických orgánů a tkání u pokusných králíků a detekce hypoteticky předpokládané lymfocytodeplece a atrofie lymfatických orgánů u pokusných králíků po suplementaci vysokými, resp. nízkými dávkami selenu. Dílčí cíle představuje histologické vyšetření lymfatických orgánů a tkání, imunohistochemické vyšetření – průkaz CD79⁺ buněk v lymfatických orgánech a tkáních, sledování koncentrace selenu v krevním séru pokusných zvířat, vyhodnocení vybraných krevních parametrů, posouzení fagocytární aktivity neutrofilů a vyhodnocení dalších souvisejících parametrů (hmotnost živých zvířat a relativní hmotnost sleziny).

Disertační práce je založena na dvou experimentech založených na suplementaci pokusných králíků anorganickou a organickou formou selenu v různých dávkách a hodnocení vlivu této suplementace na sledované lymfatické tkáně a další sledované parametry. Lze konstatovat, že metodika práce je správná a odpovídá postupu k dosažení uvedených výsledků. Kapitola Výsledky s diskuzí je členěna do 8 dílčích bodů, dosažené výsledky jsou kriticky hodnoceny a srovnávány s údaji dostupnými v literatuře. Souhrn a závěr práce odpovídá vytyčeným cílům práce.

Vlastní práce je z formálního hlediska standardní, z formálního hlediska mám pouze drobné připomínky k několika uvedeným citovaným větám v literárním přehledu, které jsou neobratně formulovány, což nepříspěvá k jejich srozumitelnosti. Příkladem budiž čtvrtá věta v kapitole 2.1.3. popisující morfologii sacculus rotundus. Používané zkratky je vhodné používat v textu shodně, v případě použité zkratky pro lymfatické noduly (LN) je v jednom případě na straně 17 místy této zkratky použita zkratka LF. U první věty na straně 50 chybí literární citace.

Z obsahové stránky poskytuje předkládaná práce ucelený přehled o vlivu suplementace různými dávkami anorganické a organické formy selenu na sledované lymfatické tkáně a sledované parametry u pokusných králíků. Velmi podrobné je zejména hodnocení změn mikroskopické struktury sledovaných lymfatických tkání, jednak v přehledném barvení (HE), dále je v předložené práci vhodně využíváno i speciálních metod včetně imunohistochemického vyšetření. Práci hodnotím jako velmi přínosnou a její význam pro praktický a teoretický rozvoj oboru spočívá v získání nových poznatků o vlivu suplementace různými dávkami anorganické a organické formy selenu na lymfatické tkáně králíka a další sledované parametry.

Na autora mám následující dotazy:

Jaká je dostupnost specifických (anti - rabbit) monoklonálních a polyklonálních protilátek, využitelných v parafínových řezech nebo v kryokatových řezech v lymfatických tkáních králíka?


Je možné v rámci imunofenotypizace lymfocytů a dalších buněk v lymfatických tkáních králíka využít ještě další křížově reagující protilátky?

Jaké další metody by podle Vás bylo vhodné využít v event. dalším výzkumu vlivu suplementace selenu na lymfatické tkáně u králíka pro detekci imunofenotypu lymfocytů a dalších buněk vyskytujících se v lymfatických tkáních?

Stanovené cíle práce splnila. Mnou uvedené připomínky jsou formálního rázu. Doporučuji předkládanou práci k obhajobě.

V Brně dne 30.11.2012

MVDr. Petr Fictum Ph.D.


**VETERINÁRNÍ A FARMACEUTICKÁ
UNIVERZITA BRNO**
FAKULTA VETERINÁRNÍHO LÉKAŘSTVÍ
Ústav patologické morfologie a parazitologie
612 42 Brno, Palackého tř. 1/3

③