

Interakce rybích fagocytů s trofozoity a cystami *Acanthamoeba* sp.: Studium mikrobicidních mechanismů *in vitro*.

Hned zpočátku chci konstatovat, že posuzované práce se mi líbí po všech stránkách, od pečlivého zpracování přes promyšlené formulování až po kritický přístup k vlastním výsledkům. Přesto je z práce cítit zklamání, že zřejmě nebyly dosaženy výsledky zpočátku očekávané. To se při práci se živým materiálem stává a nemělo by to diplomantku odradit od pokračování – z poslední kapitoly ostatně vyplývá, že se odradit nenechala. Chtěl bych se však dotázat na počáteční hypotézu: jaká byla původní představa o interakci a zda se předpokládala masivní fagocytóza velkých trofozoitů (případně cyst) améb *in vitro*.

Prvých 5 stran textu je velmi pěkně zpracovaná rešerše o specifice imunitního systému ryb. Ten je prozkoumán mnohem méně než imunitní systém teplokrevných obratlovců a metody jeho studia vycházejí z metod studia savčí imunity. Rešerše sama o sobě si zaslouží publikování.

Cíl práce je formulován velmi stručně a naznačuje, že se s fagocytózou počítalo (měření N-oxidu a superoxidu).

Metodika je naopak zpracována velmi podrobně, doplněna instruktivními obrázky a pracovní postupy jsou popsány tak, že je lze kdykoliv podle popisu zopakovat. Studentka vtipně využila zdánlivého handicapu: kapry infikované trypanosomami a trypanoplasmami použila k obohacení práce a snažila se i zhodnotit nezáměrné pomnožení ektoparazitů u karasů.

Vlastní výsledky prezentované na 8 stranách sice nepřinesly původní očekávání, ale jsou koncizní a odpovídají si navzájem. Mikroskopická pozorování, kdy byly zaznamenány pouze nedokončené pokusy o fagocytózu odpovídají relativně nízkým hodnotám produkce N-oxidu a nízkým hodnotám superoxidu stejně jako výsledkům pokusu *in vivo*.

V relativně obsáhlé diskusi se studentka vrací k metodickým potížím i k možnostem je eliminovat. Vlastní výsledky diskutuje zejména s výsledky nizozemských autorů (Saeij et al 2002), kteří zjistili rozdíl ve strategii trypanosomy a trypanoplasmy uniknout imunitnímu útoku hostitele. Jde o pracoviště, kde byla studentka na praxi a zajímalo by mne, zda tamní tým v práci pokračuje a zda byly tyto překvapivé závěry potvrzeny dalšími pokusy.

Po diskusi následují 2 jednostránkové kapitoly „Souhrn výsledků“ a „Závěr a perspektivy další práce“. Je to trochu neobvyklé uspořádání, uvítal bych spíše koncizní závěry v několika bodech. Myslím, že z výsledků ovlivněných infikovaným materiálem lze „vypreparovat“ závěr, že rybí fagocyty nefagocytují testované améby (a naopak) a že přítomnost améb pouze zvyšuje hodnoty produkce N-oxidu a superoxidu primárně způsobené jinými parazity.

Prosím studentku o potvrzení či vyvrácení tohoto závěru.

Další dotazy a připomínky:

1. Z názvu i z metodiky vyplývá, že studentka pracovala i s **cystami** améb. Nenašel jsem však jednoznačné závěry, zda se interakce fagocytů s trofozoity lišila od jejich interakce s cystami.
2. **Zvýšení produkce N-oxidu a superoxidu.** Jde o projev oxidačního vzplanutí následujícího po fagocytóze, odraz toho, co se děje ve fagolysozomu, u superoxidu přímo důsledek zabíječské aktivity. Jak by šlo aspoň teoreticky vysvětlit pozorované zvýšení produkce obou látek za předpokladu, že améby ve fagolysozomech nebyly?
3. **Výběr modelu.** Studentka podrobně diskutuje výběr ryb. Důvody pro výběr améby byly zřejmé: původ izolátu a jeho molekulárně potvrzená příbuznost s akantamébami izolovanými z očních lézí. Přesto: neztratil kmen dlouhodobou kultivací případně zmrazením virulenci? Nestálo by za úvahu pokusit se ji zvýšit pasáží *in vivo*?
4. **Způsob infekce.** Tyto dotazy jdou za rámec zadání, ptám se proto, že studentka má jistě prostudovanou literaturu a vytvořen vlastní názor. Jaké cesty infekce ryb amébami se předpokládají, tedy jakým způsobem se améba dostane do vnitřních orgánů, např. do mozku? Byly pozorovány infekce oka ryby? Jak velká je afinita rybích améb k nervové tkáni? Nelze předpokládat, že se améby s fagocyty v rybím organismu nepotkávají? U granulomatózní akantamébózy člověka není o cestě infekce do mozku nic známo.

Studentka splnila zadání práce, naučila se cenné metodiky a prokázala schopnost samostatně pracovat v laboratoři a ze získaných výsledků samostatně vyvodit závěry. Výsledky jsou publikovatelné formou krátkého sdělení nebo jako součást komplexnější práce, za publikaci stojí i samotná rešerše. Doporučuji práci k obhajobě a navrhuji hodnotit stupněm **výborně**.





Veterinární a farmaceutická univerzita Brno
Fakulta veterinárního lékařství
Ústav parazitologie
Palackého 1/3, 612 42 Brno
telefon: 541 562 262, fax: 541 562 266

Oponentský posudek na magisterskou práci Bc. Jany Bendové "Interakce rybích fagocytů s trofozoity a cystami *Acanthamoeba* sp.: Studium mikrobicidních mechanismů *in vitro*"

Předložená magisterská práce sestává celkem ze 35 stran textu je členěna na klasickým způsobem, který odpovídá požadavkům kladeným na magisterské práce obhajované na Biologické fakultě JU. Její formální úprava je na standardní úrovni a v textu lze najít jen málo překlepů.

Magisterská práce Bc. Jany Bendové tématicky navazuje a rozvíjí problematiku rybích améb, která je již delší dobu řešena na PaÚ AV ČR. Nepochybně bylo téma magisterské práce (označené na titulní straně jako diplomová práce) také ovlivněno možností pobytu Bc. Jany Bendové v laboratoři Buněčné biologie a imunologie nizozemské Wageningen University, kde vyvinuli a využívají metodické postupy použité při bakatářské práci.

Prvních 5 stran textu magisterské práce je věnováno základním informacím o imunitním systému ryb. Do literárního přehledu je dále zařazena krátká podkapitola věnovaná imunitním mechanismům při infekcích modelových savců amébami rodu *Acanthamoeba*. Cíl magisterské práce je shrnut v jedné větě na straně 5.

V kapitole *Materiál a metodika* jsou na 9 stranách popsány použité metodické postupy. Po přečtení celého textu je zřejmé, že úvodní kapitola části *Materiál a metodika* je nejdůležitější pro celkovou kvalitu magisterské práce. Považuji za zásadní, že Bc. Jana Bendová uskutečnila všechna metodicky náročná imunologická sledování na nedefinovaných rybích modelech se souběžnými (pravděpodobně nejenom prokázanými parazitárními) infekcemi. Tato skutečnost ovlivnila další práci a činí z dosažených výsledků pouze informace, které bude nutné ověřit v definovaném systému. V souvislosti s pobytem Bc. Jany Bendové na nizozemském pracovišti, které patří mezi přední pracoviště v oblasti rybí imunologie a kde byla obhájena řada disertačních prací zaměřených na rybí imunologii (<http://library.wur.nl/wda/>), je poněkud nepochopitelné, jakým způsobem byla magisterská práce Bc. Jany Bendové realizována a následně předložena k oponování. Z předchozího komentáře vyplývá (zdánlivě nelogický) dotaz, zda Bc. Jana Bendová absolvovala pobyt na nizozemském pracovišti na počátku magisterského studia, tj. před vlastními experimenty nebo až v období, když získala první výsledky.

Výčet použitých metod je velký a dokazuje časovou náročnost vlastních dílčích experimentů. Od celé řady rybích experimentů se odlišují infekce myši trofozoity *Acanthamoeba* sp. (klon 4465/I) a posuzování interakcí améb (trofozoitů i cyst) s myšimi makrofágy linie PMJ2-R - a to nejen tím, že

nekorespondují s názvem magisterské práce (Interakce rybích fagocytů s trofozoity a cystami *Acanthamoeba* sp.: Studium mikrobicidních mechanismů *in vitro*). Tyto dva dílčí pokusy nejsou zmíněny ani v cílech magisterské práce. Není tedy vůbec zřejmé, proč bylo infikováno amébami celkem 48 myší, které byly následně v různých intervalech po infekci utraceny a histologicky zpracovány.

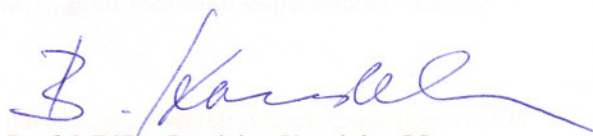
V kapitole *Výsledky* autorka magisterské práce popisuje na 9 stranách formou slovní, formou grafů, obrázků a tabulek získané výsledky. Z výsledků je zřejmá velká variabilita získaných dat, kterou lze také vysvětlit nedefinovaným výchozím materiálem. Vzhledem k uvedenému komentáři ke kapitole *Materiál metodika* nepovažuji za nutné komentovat jednotlivé výsledky.

Pro celkové posouzení kvality práce je dle mého názoru rozhodující posoudit, zda byly splněny cíle, které si autorka magisterské práce vymezila (nebo jí byly stanoveny). V tomto konkrétním případě je to možné srovnáním kapitoly *Cíl práce* (str. 5) s kapitolou *Závěry a perspektivy další práce* (str. 35). „Cíl“ je formulován v jedné větě („Zhodnotit interakci purifikované populace fagocytů kapra obecného s trofozoity a cystami *Acanthamoeba* sp. *in vitro* na základě testování produkce dusíkatých oxidů a kyslíkatých sloučenin vznikajících při oxidativním vzplanutí“) a „závěry“ ve 4 odstavcích, z nichž některé patří spíše do *Diskuse*. Po přečtení „závěrů“ magisterské práce je však možné konstatovat, že *Cíl práce* byl v principu splněn.

Bc. Jana Bendová v poslední kapitole *Závěry a perspektivy další práce* nastiňuje i další možnosti studia imunitního systému ryb, pravděpodobně v rámci DSP. Další bádání v této oblasti však není myslitelné bez vytvoření podmínek pro přípravu a chov stabilního definovaného modelu (viz laboratoř Buněčné biologie a imunologie nizozemské Wageningen University), na kterém by se další imunologické studie uskutečnily.

Jak už bylo naznačeno v předešlém textu, magisterskou práci Bc. Jany Bendové hodnotím jako problematickou. Je však zřejmé, že magisterská práce je výsledkem řešení konkrétního vědeckého úkolu a předložený spis tak splňuje požadavky kladené na magisterské práci, které jsou obecně formulovány v Studijní a zkušební řádu Biologické fakulty JU. Pokud by měly být závěry magisterské práce publikovány, je třeba získaná data podpořit experimenty na definovaných modelech. Magisterskou práci Bc. Jany Bendové doporučuji po zralé úvaze k obhajobě a hodnotím ji klasifikačním stupněm dobře (3).

V Brně 28. ledna 2005



Prof. MVDr. Břetislav Koudela, CSc.

koudelab@vfu.cz