

Posudek na magisterskou diplomovou práci Bc. Heleny Horké

Bc. Helena Horká předložila k obhajobě magisterskou diplomovou práci na téma *'Využití real time-PCR pro studium klíštěcími slinami aktivovaného přenosu borelií'*, kterou vypracovala v Laboratoři interakcí vektor-hostitel. Diplomová práce o rozsahu 70 stran má všechny potřebné náležitosti a je součástí týmového programu laboratoře doc. Jana Kopeckého. Metodicky, aplikací metody PCR v reálném čase, navázala autorka diplomové práce na předcházející magisterský diplomový projekt Martiny Macháčkové a s úspěchem využila její protokol ke kvantifikaci borelií v kožních lezích hostitelů a v přítomnosti klíštěcích slin či extraktu ze slinných žláz klíšťat.

Po formální i obsahové stránce se jedná o velmi kvalitně vypracovaný spis. Bylo téměř nemožné nalézt byť jenom drobnou chybu či formální pochybení, Výsledky získané autorkou práce jsou náležitě podpořeny statistickými výpočty. Práci bylo vskutku radost číst, je napsána velmi čtivým způsobem s vyváženým obsahem informací ve všech jejích částech, to platí zejména o bezvadném úvodu. Dnes máme u nás na fakultě/Parazitologickém ústavu celou kolekci studentských prací na téma interakce borelií/viru KE s hostitelem, o to více si jako oponent všímám originality každého dalšího příspěvku do této tématické řady. Nebylo tomu ani tentokrát jinak a tak jsem velice rád, že mohu potvrdit jednoznačně, že Helena Horká se vypořádala se všemi částmi práce včetně úvodu svým osobitým a originálním způsobem. Chválím velice! Vedle klasických údajů z této oblasti, které je třeba vždy znovu zopakovat a připomenout se Heleně podařilo vybrat šťastným způsobem novinky z oblasti antigenních determinant borelií, jejich genů a funkčních vlastností, jakož i z oblasti molekulových faktorů ve slinách klíštěcích vektorů. Domnívám se, že úvodní stať by si zasloužovala publikovat samostatně v některém vědu popularizujícím časopisu (Vesmír/Živa) případně v odborném zdravotnickém periodiku.

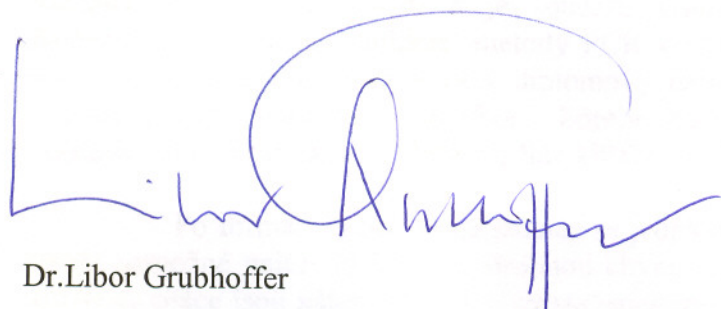
Našel jsme snad jediné malé pochybení, to když autorka zmiňuje taxonomické začlenění klíšťat a hovoří na str. 11 o Ixodides jako o podřádu a v zápětí o řádu. Autorka měla zřejmě na mysli podřád Ixodida z řádu Parasitiformes, tolik na upřesnění.

Cíle práce jsou jasně formulovány, stejně tak kapitola 'Materiál a metody' zasluhuje pochvalu za dostatečnou podrobnost, přehlednost a obsahovou jasnost. Připomínku mám pouze k oddílu 3.7.1. (design experimentální infekce), rozpis experimentů by mohl lépe/výstižněji odpovídat grafům s výsledky, např. Graf č. 1 a další analogické, zejména s ohledem k postavení kontrol.

Výsledky dosažené budí po právu mimořádný zájem nás všech, kteří se těmito věcmi zabýváme, staly se také předmětem diskusí v našich laboratořích a plánování nějakého většího navazujícího projektu. Přesto nebo právě proto bych se chtěl *autorky zeptat, jak si vysvětluje statisticky průkazné rozdíly v replikaci borelií v kůži (4 dpi) mezi jednotlivými skupinami v experimentu.* Rozumím časové závislosti replikačních procesů, nicméně opět se ptám Heleny, čím si vysvětluje ten dramatický rozdíl v kůži mezi 1 dpi a 4 dpi v přítomnosti slin. Kapitoly s výsledky, diskusí i shrnutím zasluhují stejnou pochvalu jako ostatně celá magisterská diplomová práce. Ani v přehledu citovaných pramenů se mně nepodařilo narazit na některý z chronických přestupků.

Závěrem, s radostí a klidným svědomím mohu konstatovat, že Bc. Helena Horká se zhostila zadání své magisterské diplomové práce obrazně i doslova na jedničku, doporučuji proto její práci k obhajobě a předpokládám, že se jí Helena zhostí stejně úspěšně.

Posudek vypracoval v Českých Budějovicích dne 26. ledna 2007:

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Libor Grubhoffer', with a large, stylized flourish above the name.

Dr.Libor Grubhoffer

Posudek na diplomovou práci

Název práce: Využití real-time PCR pro studium klíštěcími slinami aktivovaného přenosu

Autor: Bc. Helena Horká

Adresa: Biologická fakulta Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích

Jak už z názvu vyplývá, diplomová práce je zaměřena na studium účinků klíštěcích slin na přenos patogenů, konkrétně na modelu *Ixodes ricinus* – *Borrelia burgdorferi*. Vliv slin na přenos patogenů byl popsán nejen u klíšťat, ale také u krevsajících hmyzu – komárů, flebotomů a muchniček. Jedná se o jedno z aktuálních témat současného parazitologického výzkumu nejen u nás, ale i ve světě.

Literární přehled na 13 stranách shrnuje základní poznatky o studovaném modelu borelie – klíště – hostitel, v poslední kapitole pak představuje použitou metodu real-time PCR. Jednotlivé kapitoly na sebe logicky navazují a jsou napsány čtivým vědeckým jazykem. **Cíle práce** definují 4 základní body, které zahrnují všechny aspekty studovaného problému: průběhu infekce, vliv slin, sání a extraktu slinných žláz na průběh infekce i vliv na přenašeče. Kapitola **materiál a metody** je dostatečně podrobná. Autorka se seznámila nejenom s metodou real-time PCR, ale např. i s kultivací borelií, pitvou slinných žláz klíšťat, sběrem klíštěcích slin nebo prací s experimentálními zvířaty. **Výsledky** experimentů jsou zpracované vynikajícím způsobem. Autorka se s velkým množstvím získaných dat v kapitole 4.3. vypořádala velice úspěšně přehlednými grafy. Oceňuji, že jsou v kapitole 4.4.3. zmíněny i neúspěšné pokusy. Je důležité, aby takovéto výsledky nezůstaly ležet někde v šuplíku, ale byly k dispozici pro plánování podobných pokusů. Osmistránková **diskuze** detailně porovnává získané výsledky s publikovanými údaji a na závěr jsou shrnuty nejdůležitější výsledky. **Citovaná literatura** obsahuje úctyhodných 165 citací původních prací i literárních rešerší, včetně těch nejnovějších. Součástí seznamu jsou i 2 odkazy na citované webovské stránky. Práci vhodně doplňuje **seznam použitých zkratk**.

Celá práce je pečlivě zpracovaná, logicky uspořádaná, s kvalitní grafickou úpravou a je dobrým podkladem pro zpracování získaných výsledků (především kapitola 4.3.) pro publikaci v impaktovaném časopise. Schopnost autorky pracovat v oblasti vědeckého výzkumu dostatečně dokumentuje fakt, že je řešitelkou grantu, kterým byla tato práce financována. Svým rozsahem práce plně splňuje podmínky kladené na diplomovou práci, a proto ji doporučuji k obhajobě.

V Praze dne 21. ledna 2007

Rohoušová Iva

RNDr. Iva Rohoušová, Ph.D.

Otázky a připomínky:

Literární přehled

str. 9, odstavec 5

str. 11, odstavec 2

„*B. garinnii* je neurotropní ...“ – překlep

„... tvorba protilátek proti OspC u myši vyvolává snížení exprese OspC, a tak tyto protilátky nemohou být protektivní.“ Na str. 8 (odstavec 3) se však píše, že exprese OspC je nezbytná pro infekci hostitele. Proč tedy protilátky proti OspC nemohou být protektivní, když snižují expresi tohoto proteinu?

str. 13, odstavec 2

„... a vzniklá tekutina se vrací ...“ Možná by bylo lepší napsat

„přebytečná tekutina“, ale to je spíše otázka stylu psaní.

str. 13, odstavec 4

„... přenos patogenů je spíše transstadiální ... transovariální přenos je neefektivní ...“ Patogenem se zde myslí pouze borelie nebo obecně všichni patogeni přenášení klíšťaty *I. ricinus*?

str. 15, odstavec 1

„Peasen a kol. izoloval ...“ Měla bych dvě připomínky: (1) bylo by vhodnější napsat sloveso v plurálu, když už to byl ten kolektiv a ne jenom jeden autor, (2) toto je citace a je třeba u ní doplnit rok (objevuje se to i jinde v Literárním přehledu a v Diskuzi) – „Peasen a kol. (1999) izolovali ...“ - a pak už je zbytečné totéž opakovat na konci věty.

str. 15

Liší se funkční složení slin samců a samic? Pokud ano, uvedené informace se týkají jakého pohlaví? Jsou ve slinách klíšťat také neproteinové imunomodulátory?

str. 16, odstavec 3

„... avšak zde proběhl odběr myších tkání až 8 týdnů po infekci, a proto pozorovaný efekt nelze jednoznačně přičíst SGE.“ Jak dlouho lze pozorovat SAT efekt? Je možné pozorovat SAT efekt i po inokulaci borelií do místa, kde předtím sálo klíště (tedy s jistým časovým odstupem mezi sáním klíštěte a inokulací borelií)?

Nesjednocené zkracování druhových názvů v textu; např.:

str. 9, odstavec 5

B. × *Borrelia* na začátku věty

str. 14, odstavec 1

I. scapularis × *Ixodes scapularis*

Materiál a metody

str. 20, kap. 3.2.

Co je směsný boreliový antigen? A proč byl použit?

str. 20, kap. 3.3.1.

O jaká antibiotika se jednalo? V tomto případě by možná bylo vhodné uvést katalogové číslo.

str. 20, kap. 3.3.2.

Je možné použít pro počítání borelií Bürkerovu komůrku?

str. 21, kap. 3.4.1.

O jaké inhibitory proteáz se jednalo? V tomto případě by možná bylo vhodné uvést katalogové číslo. Jak koncentrované byly použité vzorky SGE? Kolik žláz se pitvalo do daného objemu 1 ml PBS? Proč byl zvolen právě PBS pufr? **Byly vzorky SGE před použitím přefiltrovány?**

str. 21, kap. 3.4.2.

Jaká byla výsledná koncentrace proteinů v SGE? Dá se říci, jaká je koncentrace proteinů v jedné žláze?

str. 21, kap. 3.5.

Jaká byla výsledná koncentrace proteinů ve slinách?

str. 22, kap. 3.6.1.

Proč byl zvolen jako ředící médium pro anestezii PBS pufr a ne třeba fyziologický roztok?

Proč byly zvoleny různé koncentrace SGE×sliny u skupiny 2 a 3? (Může být pozorovaný efekt závislý na koncentraci proteinu v inokulu?)

Liší se složení a efekt slin dospělců a nymfálních stádií (skupina 2 a 3 × skupina 4)?

- str. 23, kap. 3.7.1. Proč byl zvolen tak malý počet zvířat v jedné skupině? Jaký časový interval byl mezi infekční dávkou a přiložení nymf? Tato informace by mohla být důležitá zejména v souvislosti s imunitní odpovědí hostitele, jestli měl hostitel čas reagovat na podaný antigen (SGE/sliny) než byl vystaven slinám sajících nymf.
- str. 24, kap. 3.8.4. Jak a čím se homogenizuje klíště?

Výsledky

- kap. 4.1. Pro studenty, kteří budou na tuto práci navazovat, by bylo dobré zmínit i parametry ostatních testovaných kombinací, aby bylo zřejmé, proč byla vybrána právě tato polymeráza a primery.
- kap. 4.2. Byl tento test opakován? Jaká je reprodukovatelnost metody?
- kap. 4.3. To obrovské množství informací je uspořádáno velice přehledně. Trochu matoucí jsou jenom shrnující grafy, pod kterými je uvedena další kapitola (např. na str. 34 graf 4 o ušním boltci × kapitola o mízních uzlinách) a čtenář může mít tendenci hledat informace uvedené v textu na onom grafu.
- kap. 4.4. **Když porovnáím tyto výsledky s obdobným pokusem v předchozí kapitole (str. 31, graf 1B) u skupiny s infekční dávkou borelie+PBS+nymfy (liší se pouze počtem nymf 12×15 kusů), tak jednou byl pozorován signifikantní stimulační vliv sání na množni borelií a podruhé sání nemělo žádný vliv. Jak si to vysvětlujete?**

Diskuze

- str. 46, odstavec 2 „... studii vlivu SGE na boreliovou infekci provedl v témže roce Zeidner a kol. ...“ Podobně jako v Literárním přehledu; toto je citace a je třeba u ní doplnit rok. Rok, kdy byla práce publikována nemusí souhlasit s rokem, kdy byla studie provedena.
- str. 47, odstavec 2 „V tak časném intervalu zřejmě nelze hovořit o zvýšené proliferaci spirochet v kůži, ...“ Jak rychle se množí borelie?
- str. 47, odstavec 2 **„Nulový efekt SGE v kůži připisují jeho špatné kvalitě.“ Spolu se sáním nymf bylo SGE velice účinné a stimulovalo množeni borelií. Byl v obou experimentech použit stejný vzorek SGE? Co znamená „špatná kvalita SGE“?**
- str. 48, odstavec 4 Mají sliny přímý vliv na množeni borelií nebo sliny svým vlivem na hostitele pouze připravují vhodnější prostředí pro množeni borelií?
- str. 48, odstavec 4 „Slinami aktivovaný přenos je druhově specifický ...“ Pokud je *I. ricinus* vhodnějším vektorem pro *B. afzelii*, proč nebyl pro pokusy zvolen tento druh borelie?
- str. 50, odstavec 1 **Plánujete studovat druhovou specifitu vlivu SGE/slin/sání na jednotlivé druhy borelií?**
- str. 50, odstavec 1 „V určitém množství se tyto inhibitory vyskytují i ve vzorcích DNA izolované z krve pomocí specializovaných komerčních kitů.“ Zkoušeli jste izolovat DNA bez kitu, popř. porovnat vliv DNA izolované různými technikami na citlivost PCR detekce borelií?