

Genetická variabilita přírodních izolátů viru Ťahyňa

Práce Bc. Patrika Kiliána „Genetická variabilita přírodních izolátů viru Ťahyňa“ se zabývá srovnáním 18 izolátů viru Ťahyňa z komárů a dvou referenčních kmenů, neurálně a extraneurálně pasážovaného, na základě sekvenční analýzy malého a středního genomického segmentu a dříve zjištěných biologických vlastností kmenů. V Tab. 5 uvádějící počty nukleotidových a aminokyselinových záměn mezi jednotlivými kmeny je zahrnut a analyzován ještě jeden další kmen. Předložená práce obsahuje 42 stran textu a přílohy na 15 stranách.

Práce je dělena do kapitol: Úvod, Cíl práce, Literární přehled, Materiál a metody, Výsledky, Diskuze, Závěr, Seznam použité literatury a Přílohy.

Cíl práce je stručně a jednoznačně vytyčen.

Literární přehled svědčí o bohaté znalosti literatury recentní (až do roku 2010) i starší a autor v něm proporcionálně vystihl řešenou problematiku. Je dělen do subkapitol: 1.

Bunyaviridae, 2. Virus Ťahyňa: Historie, distribuce a cirkulace v přírodním ohnisku, Struktura viru Ťahyňa, Velký segment, Střední segment, Malý segment, Replikace ve vnímavé buňce, Replikace TAHV v komárech a savčích hostitelích.

Materiál a metody jsou uvedeny přehledně a děleny do podkapitol: Virus, zahrnující seznam použitých kmenů a dříve zjištěné biologické vlastnosti, dále Izolace virové RNA, reverzní transkripce a PCR, Separace produktů PCR na agarovém gelu, Fylogenetická analýza a Bioinformatická analýza.

Výsledky jsou děleny do dvou podkapitol hodnotící sekvenční analýzu středního a malého genomického segmentu. Jsou dokumentovány třemi obrázky a dvěma tabulkami přímo v textu a dalšími přílohami na konci práce. Fakt, že autor výsledky ve stručné formě publikoval v prestižním zahraničním virologickém časopise, svědčí o jejich teoretickém významu na mezinárodní úrovni.

Diskuze na šesti stránkách rozebírá dosažené výsledky a srovnává je se zkušenostmi jiných autorů zejména ve vztahu k virulenci. Hodnocení je střízlivé a věcné.

V kapitole **Závěr** jsou stručně a věcně shrnuty dosažené výsledky.

Předložená práce celkově svědčí o vysoké úrovni odborné vybavenosti autora řešené problematiky. Práce je psána koncizně, velmi přehledně a srozumitelně, stylisticky je na velmi dobré úrovni, logicky sestavená. Jazykově je na dobré úrovni, není používána laboratorní hantýrka.

K práci nemám žádné zásadní výhrady ani připomínky, snad jen drobné poznámky a dotazy, které v žádném případě nesnižují celkovou vysokou hodnotu předložené práce.

Str. 4 – autor uvádí TAHV jako první izolovaný virus z komárů ve střední Evropě. Má povědomost i izolaci viru z komárů v té době jinde v Evropě?

Str. 5 – pokud jde o hostitele TAHV doporučila bych citovat kapitoly Málkové a Kolmana v monografii Ťahyňa virus natural focus in Southern Moravia z r. 1980 uvádějící přehledně všechny četné do té doby publikované práce.

Str. 16 – citací Šimková, Sluka, 1973 bych doporučila dokumentovat první izolaci TAHV z krve člověka v r. 1972 ve 3. ř. téhož odstavce.

Str. 16 – v kapitole Klinický obraz onemocnění považuji jako nutné doplnit práce Bárdoš et al., 1975 a 1980 o izolaci viru z krve a klinických projevech viru TAHV u dětských pacientů, eventuálně citovat příslušnou souhrnnou kapitolu Šimkové týkající se epidemiologie a etiopatogenetického významu TAHV ve výše uvedené monografii.

Str. 17 – autor uvádí, že použité TAHV kmeny byly izolované Danielovou - doplnila bych se spolupracovníky.

Závěr

V práci bylo dosaženo vytčených cílů. Jejich pojetí je výstižné a dobře podané. Svědčí o tom, že autor je schopen se snadno vypořádat se zadanou tematikou i jejím literárním zpracováním. Sama práce je cenným přínosem nejen v arbovirologii, ale i obecné virologii vůbec.

Práce splňuje všechny požadavky kladené na magisterskou disertační práci a doporučuji její přijetí a nejvyšší ohodnocení.

V Praze dne 20. května 2010.


RNDr. Vlasta Danielová, DrSc.

Oponentský posudok na diplomovú prácu Bc. Patrika Kiliana:

“Genetická variabilita prírodných izolátů viru Ťahyňa”

Predložená práca obsahuje 57 strán zaradených do deviatich kapitol. V práci je spracovaných 112 bibliografických údajov. Práca po formálnej stránke spĺňa všetky potrebné náležitosti. Svojím rozsahom sa zdá byť pomerne stručná, avšak vyplýva to z charakteru získaných výsledkov. Oceňujem, že sa autor nesnažil ju umelo zväčšiť neprimerane dlhým literárnym prehľadom či diskusiou a práca je vďaka tomu veľmi dobre čitateľná.

Cieľom predloženej diplomovej práce bola sekvenčná analýza S a M genomických segmentov dvadsiatich, biologicky odlišných izolátov vírusu Ťahyňa a následný pokus o identifikáciu molekulárnych determinantov virulencie vírusu. Tieto cieľ považujem za veľmi ambiciózne a prínosné a oceňujem aj zameranie sa na v súčasnosti nie veľmi často študovaný vírus.

Literárna časť práce je veľmi prehľadne a zrozumiteľne napísaná (pre vedeckú prácu občas až príliš vzletným štýlom). Príkladne kombinuje historické práce s najnovšími štúdiami a vhodne využíva poznatky získané na príbuzných vírusoch, nielen v rámci rodu Orthobunyavirus, ale aj celej čeľade Bunyviridae.

Materiál a metódy sú popísané prehľadne a zrozumiteľne. Vzhľadom k tomu, že ide o metodicky pomerne priamočiaru tému, mohli byť popísané aj detailnejšie. Sekvenovanie je napríklad ukryté v podkapitole o elektroforéze, aj keď išlo o kľúčovú metodiku práce. Na druhej strane oceňujem výber fylogenetických metód vzhľadom k analýze veľmi podobných sekvencií.

V práci boli kompletne osekvenované S a M segmenty 20 izolátov vírusu Ťahyňa. Aj keď je kapitola rozsahom strán nezvykle stručná, množstvom výsledkov asi aj prekonáva bežný rozsah diplomovej práce. Získané kompletne sekvencie zásadne rozšírili množstvo dostupných genomických dát v databáze GenBank, ktoré sa doteraz obmedzovali takmer výhradne na prototypový vírus.

Pokus o určenie genetických determinantov virulencie, či iných biologických vlastností prináša množstvo zaujímavých a podnetných poznatkov. Ako však autor sám správne zhodnotil, predstavujú len prvotný zoznam kandidátov, ktoré by bolo potrebné ďalej laboratórne overiť, ideálne metódou reverznej genetiky. To by už ale práca vysoko prekročila rámec diplomovej práce.

Získané výsledky sú v Diskusii kriticky zhodnotené a zhrnuté. Sú tiež vhodne porovnané z výsledkami iných autorov získaných na príbuzných vírusoch, keďže v rámci Ťahyňa vírusu ide o prvú štúdiu takéhoto druhu a rozsahu.

K práci mám len niekoľko drobných pripomienok zameraných na formálnu stránku práce:

- Keďže sa dlhodobo vo svojej práci venujem hantavírusom, nedá mi neopraviť drobnú chybičku v literárnom prehľade na str. 3, že názov hantavírusy nie je odvodený od názvu rieky Han, ale rieky Hantaan, podľa ktorej bol pomenovaný prototypový vírus.
- V tabuľke č. 1 považujem za trochu zavádzajúce označenie človeka ako „hostiteľa“ spomenutých vírusov. Predsa len je človek u všetkých týchto vírusov len náhodným hostiteľom (dead-end-host), ktorý sa nepodieľa na cirkulácii vírusov v prírode.
- V obrázku č. 1 mi uniká zmysel šípky smerujúcej od vajčiek priamo k samčekovi.

- V tabulke č. 2 by pri veľkosti plakov bolo vhodné špecifikovať, na akej bunkovej kultúre bolo toto porovnanie robené.
- Fylogenetický strom na obrázku č. 8 by si ako jeden z kľúčových výstupov práce zaslúžil trochu detailnejšie spracovanie. Bolo ho napríklad kvoli prehľadnosti vhodné obohatiť údajmi o lokalite, druhu komára, či roku izolácie. Taktiež bolo vhodné ukázať nielen consensus strom, ale aj najlepší strom v mierke (in scale) a ukázať výsledky oboch použitých metód. Samozrejme by to neovplyvnilo závery práce, ale aj vzhľadom k rozsahu kapitoly ju mohlo trochu obohatiť.

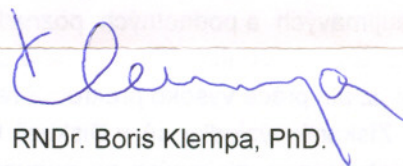
Pre autora mám aj dve otázky, či skôr námety na diskusiu.

1. Je si autor vedomý, že napriek osekvenovaniu kompletných segmentov fakticky neurčil kompletnú nukleotidovú sekvenciu sekvenovaných segmentov? Akú metódu by navrhol, aby určil naozaj kompletnú sekvenciu?
2. Získané výsledky by bolo veľmi vhodné overiť metodikou reverznej genetiky. Je takýto systém pre Ťahyňa vírus už popísaný? Ak nie, je už podobný systém vyvinutý pre iné príbuzné vírusy, ktorý by mohol slúžiť ako vzor?

Celkovo hodnotím predloženú prácu vysoko pozitívne. Za najvýznamnejšie prínosy považujem zameranie na málo študovaný vírus, veľké množstvo použitých izolátov, určovanie kompletných sekvencií, ako aj dobrú čitateľnosť práce. O jej kvalite jednoznačne svedčí aj publikovanie jej výsledkov v renomovanom medzinárodnom časopise.

Na základe vyššie uvedených dôvodov navrhujem ohodnotiť predloženú diplomovú prácu stupňom A (výborne).

V Bratislave, 26.05.2010


RNDr. Boris Klempa, PhD.