

## Posudek na magisterskou práci

Název práce: Patogeneze klíšťové encefalitidy a její ovlivnění genetickým pozadím hostitele

Autor: Bc. Martin Palus

Předkládaná diplomová práce byla vypracována pod vedením RNDr. Daniela Růžka, Ph.D. na Katedře medicínské biologie Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích.

Cíl byl definován ve třech bodech:

- infikovat myši rekombinantní kmeny série CcS/Dem virem klíšťové encefalitidy (VKE) a zaznamenat rozdíly u jednotlivých kmenů v parametrech charakteristických pro průběh nemoci
- stanovení změn exprese imunologicky významných genů v mozkové tkáni u vybraných kmenů myši v souboru CcS/Dem po infekci VKE a srovnání dvou různých způsobů inokulace viru
- charakterizace produkce neutralizačních protilátek a stanovení titru v krvi po infekci VKE

V úvodu jsou na 12 stranách přehledně zpracovány informace o VKE – biologická charakteristika, klinické projevy a patogenese infekce VKE. Zvláště pak je kladen důraz na imunitní odpověď hostitele a její vliv na rozvoj imunopatologií v CNS.

Nechybí informace o modelovém organismu vhodném pro studium komplexních chorob – rekombinantních kongenních kmenech.

Metodiky jsou zpracovány na 7 stranách. Kromě práce s laboratorními zvířaty a buněčnými kulturami musel autor zvládnout i pokročilé metody molekulární biologie (RT PCR, analýza genové exprese). Důležitou součástí této práce bylo i statistické zpracování výsledků.

Výsledky experimentů jsou pečlivě zpracovány na 28 stranách + 2 stranách příloh. Nermalou část tvoří přehledné grafy (25 grafů) a tabulky (2 tab.).

V diskuzi (6 stran) porovnává autor získané výsledky s publikovanými pracemi jak ohledně klinického průběhu klíšťové encefalitidy, tak změn exprese škály významných molekul zahrnutých v aktivaci imunitního systému. Jsou rozebírány otázky související se zvýšenou permeabilitou hematoencefalické bariéry. Autor srovnává vývoj imunopatologických reakcí v mozkové tkáni a tvorbu virus- neutralizačních protilátek v séru v závislosti na způsobu inokulace VKE.

Citovaná literatura obsahuje 88 citací původních prací i literárních rešerší. Celá práce je pečlivě zpracovaná, s kvalitní grafickou úpravou a obsáhlým seznamem zkratk.

K práci mám několik připomínek a otázek:

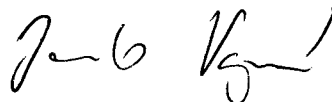
Připomínky:

- U experimentů není uváděn věk a pohlaví myši – oba faktory by mohly experiment ovlivnit.
- Není vysvětleno, jak byla u grafů vypočítána odchylka.
- Chybí seznam chemikálií.
- Raději bych užívala výrazu chemokiny a cytokiny než chemokíny a cytokíny.
- Občas se vyskytují překlepy (str. 7, 10, 11, 14, 52).

Otázky:

- Do jakých orgánů virus v těle proniká a které buňky jsou v orgánech napadány?
- Nemůže inhalační anestetikum při vážení (obden) ovlivňovat mozkové funkce, a tím i průběh experimentu? Jaké anestetikum bylo používáno?
- Jaké procento (počet) myši vykazovalo u kmene CcS-11 a CcS-15 v den 16 prudký pokles teploty?
- Podle jakých kritérií byl proveden výběr cytokinů a chemokinů pro expresní analýzu?

Autor prokázal schopnost samostatně se orientovat v dané problematice a úspěšně zvládnout náročné laboratorní techniky. Výše uvedené připomínky nesnižují přínos a úroveň této práce, a proto ji navrhuji přijmout jako práci diplomovou a klasifikovat ji známkou výborně.



V Praze 16. 1. 2012

RNDr. Jarmila Vojtíšková, CSc.



**Název práce: Patogeneze klíšťové encefalitidy a její ovlivnění genetickým pozadím hostitele**

**Autor práce:** Bc. Martin Palus

**Oponent práce:** Ing. Karel Bílek, Ph.D.

Autor předkládané diplomové práce si zvolil aktuální téma patogeneze klíšťové encefalitidy resp. vlivu genetického pozadí hostitele na její projev. Pro zjištění vlivu genetického pozadí na projev klíšťové encefalitidy byly zvoleny rekombinantní myši kongenních kmenů CcS/Dem.

Práce má klasické členění vědecké práce a jednotlivé kapitoly jsou obsahově a rozsahem vyvážené. V úvodu práce je popsána struktura viru, klinické projevy klíšťové encefalitidy u člověka a patogeneze infekce viru klíšťové encefalitidy. Druhá polovina úvodu popisuje úlohu vybraných genů při infekci. V posledně jmenované části jsou uvedeny informace, které by bylo vhodnější uvést v diskusi. Na druhou stranu mi v této části chybí alespoň stručná charakteristika vybraných genů, resp. popis jejich funkce v organismu. V úvodu také není definováno, co si autor představuje pod pojmem „genetické pozadí“. Celkově ale úvod působí komplexním dojmem, ve kterém jsou uvedeny veškeré informace potřebné pro další text a výsledky.

Cíle práce byly jasně stanoveny a pro dosažení výsledků byly zvoleny vhodné postupy. Cílem práce bylo zejména infikovat soubor myší různých kmenů z řady CcS/Dem virem klíšťové encefalitidy a zaznamenat míru letality, střední dobu přežití, změny tělesné teploty atd. Dále pomocí RT-qPCR stanovit změny exprese vybraných imunologicky významných genů v mozkové tkáni. Oba výše uvedené cíle byly studovány jak pro intracerebrální, tak pro subkutánní inokulaci virem. Posledním vytyčeným cílem bylo charakterizovat produkci neutralizačních protilátek u vybraných kmenů myší z řady CcS/Dem.

V kapitole Materiál a metody jsou na necelých osmi stranách stručně popsány pokusné podmínky, buněčné linie atd. Ke škodě práce jsou, dle mého názoru, některé postupy a metody popsány až moc stručně. V práci není například vůbec uvedeno, zda byla izolovaná RNA podrobena kontrole kvality a zda byla měřena její koncentrace. V práci je také uvedeno nemnoho informací ohledně PCR resp. popisu, optimalizaci metody apod.

Kapitola Výsledky přehledně a precizně shrnuje jak textem, tak pomocí grafů a tabulek zjištěné hodnoty a dosažené výsledky. V textu je také dostatečně vysvětleno, proč byly použity pouze tři vybrané kmeny a to BALB/c, CcS-11 a STS. Výsledky jsou podpořeny i statistickými informacemi. Pro publikaci, která bude jistě výsledkem práce, bych navrhoval statisticky porovnat i změnu exprese mezi jednotlivými dny. Pro magisterskou práci jsou uvedené výsledky dostačující a jejich prezentace je maximálně přehledná. V závěru diskuse jsou uvedeny návrhy a plány pro další výzkum.

V kapitole Diskuse jsou výsledky dostatečně diskutovány na šesti stranách s aktuálně dostupnými zdroji. V kapitole jsou také obvykle uvedeny krátké úvody doprovázené citací pro

V Závěru práce jsou uvedeny tři body, které korespondují s cíli práce a přehledně tak shrnují dosažené výsledky.

Připomínky k textu:

- str. 1: výraz ORF není dostatečně vysvětlen (v Seznamu zkratk ale výraz uvedený je)
- str. 3: výraz UTR je ve větě uveden v závorce za ORF
- str. 5, 14: chybí čárka v citaci mezi jménem a rokem publikování
- str. 5, 6, 16, 17 atd.: jsou chybně uvedeny % a °C (není totéž 10% a 10 %, stejně tak se v ČR uvádí mezera mezi hodnotou a °C)
- na str. 14: je chybně uvedeno číslo genomové sekvence pro VKE – správné GeneBank číslo je U27495 (v textu chybně uvedeno: U17495)
- str. 15: zkratka PFU je popsána až u druhé zmínky ...
- na str. 19 je uvedena citace pro metodu  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Babu et Nutman, 2003), ale prvně metodu publikovali: Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C(T)}$  Method. Methods, 2001, 25, 4, p. 402-408.

Dále mám k autorovi následující dotazy:

- Mohl byste charakterizovat výraz „genetické pozadí“?
- Mohl byste popsat, jak bylo prováděno měření kvality, čistoty atd. RNA?
- Mohl byste vysvětlit výraz housekeeping gen, resp. udržovací gen a proč jste si zvolil pro studii právě ACTB gen?

Závěr

Celkově mohu konstatovat, že předložená práce Bc. Martina Paluse splňuje všechna kritéria vyžadovaná pro magisterské práce. Autor zpracoval aktuální téma a prokázal potřebné teoretické znalosti a praktické dovednosti nezbytné pro experimentální řešení vytčených cílů. Na základě těchto skutečností doporučuji předloženou práci k obhajobě a současně doporučuji, aby Bc. Martinu Palusovi byl po úspěšné obhajobě udělen titul Mgr.

V Kamenné dne 18. 1. 2012

Karel Bílek

