

Oponentský posudek na diplomovou práci Bc. Anny Mynářové
**„Prevalence a diverzita kryptosporidií, giardií a mikrosporidií u orangutanů
(*Pongo spp.*) a vliv vybraných rostlinných extraktů na průběh experimentální
infekce *Encephalitozoon cuniculi* u BALB/c myši“**

Práce Anny Mynářové je kvalitní a rozsáhlou diplomovou prací. Rozsáhlá je nejen množstvím textu (a úctyhodným množstvím citované literatury – nebyl jsem schopen citace spočítat, ale odhaduji, že jich je přes tři stovky!), je rozsáhlá i metodicky: Anna využívá experimentální nákazy zvířat, pitvy, molekulární metody, fylogenetické a statistické analýzy. Práce přináší zajímavé nové poznatky – jak o parazitologii orangutanů, tak o účincích rostlinných extraktů (včetně neočekávaného zjištění o účincích huseníčku).

K práci mám následující připomínky.

- Na svůj rozsah je tato práce velice chudá na gramatické chyby a překlepy. Několik chybek se mi najít podařilo. Asi nejvýraznější je v názvu i čísle kapitoly na str. 9 (má to být kapitola „1.1.7.2 *Encephalitozoon spp.*“, nikoli „3.1.7.2 *Enterocytozoon spp.*“); tato chyba je zreplikována i v obsahu.
- Myslím, že autorka nakládá trochu lehkomyšlně se zkratkami: význam některých z nich je třeba uveden až po několika použitích (např. SIV: uvedena již na str. 10, vysvětlena na str. 12). Význam některých zkratk uveden není, nepřehlédl-li jsem se (např. „IGS“). Možná by se hodil seznam užitých zkratk.
- Mírně mě dráždilo implicitní nezapočítávání lidoopů mezi opice vyjádřené jak ve strukturování textu (kapitoly typu „mikrosporidie u opic“ a „mikrosporidie u lidoopů“) tak místy v textu (str. 8: „[*Enterocytozoon* u] šimpanzů, goril a opic“). Lidoopi jsou také opice (distinkce mezi „ape“ a „monkey“ v angličtině nekoresponduje zcela přesně s českou terminologií).
- V metodice se lze na několika místech (izolace DNA, str. 45 a 53, extrakce z gelu, str. 49) odkázat na návody výrobců použitých kitů, na můj vkus je v těchto pasážích text zbytečně podrobný. Naopak na str. 50 by mělo být u popisu použití metody maximum likelihood uvedeno konkrétní nastavení: jaký evoluční model byl použit, do kolika kategorií byly pozice rozděleny.
- Tabulka 6 je na str. 25 i 46 (pokaždé jiná; jde o chybu číslování).
- „Jak“ se česky píše „jak“ a ne „yak“ (str. 70).

Žádná z výše uvedených výhrad není závažná. Práci rozhodně **doporučuji** k obhajobě. Mám na autorku dva dotazy:

- 1) Lze z nasbíraných dat učinit alespoň hrubý odhad dynamiky onemocnění ve studovaných orangutanech? Neboli: byly vzorky alespoň z některých pozitivních orangutanů odebrány vícekrát? Pokud ano, byly po zopakování vyšetření stále pozitivní, nebo infekce vymizela resp. se stala danou metodou nedekovatelnou?
- 2) Nestálo by za to věnovat pozornost brukvovitým rostlinám? Nabízí se otestovat účinek glukosinolátů. Nejsou v tomto ohledu už k dispozici nějaké studie?

15. 1. 2016 v Českých Budějovicích

Mgr. Martin Kostka, Ph.D.



Oponentský posudek na diplomovou práci Bc. Anny Mynářové

Prevalence a diverzita kryptosporidií, giardií a mikrosporidií u orangutanů (*Pongo* spp.) a vliv vybraných rostlinných extraktů na průběh experimentální infekce *Encephalitozoon cuniculi* u BALB/c myší

Předložená diplomová práce je složena ze dvou částí. První se zabývá zhodnocením prevalence a diverzity tří druhů parazitických protist u dvou druhů orangutanů žijících na Sumatře a Borneu. Druhá část je čistě experimentální, a sleduje vliv čtyř vybraných rostlinných extraktů s potenciálními antiparazitickými účinky na průběh infekce mikrosporidií *Encephalitozoon cuniculi*. Již na první pohled je zřejmé, že autorka odvedla obrovské množství práce.

Diplomová práce je zpracována velmi pečlivě a detailně, je přehledná a pěkně se čte. Obsahuje pouze minimální množství gramatických chyb a překlepů. Práce je strukturována standardním způsobem, s vhodně zvolenou délkou jednotlivých kapitol. Úvod (literární rešerše) na 41 stranách je přehledný a jeho podstatná část je věnována problematice studovaných parazitů. Cíle práce jsou jasně formulovány a splněny. Dosažené výsledky jsou zřejmé. Diskuse na 8 stranách je dobře strukturována a opírá se o vlastní výsledky. Seznam použité literatury čítá úctyhodných 30 stran původních i zcela recentních publikací. Přínos práce spatřuji i v jejím možném dalším využití pro aplikovaný výzkum.

K práci mám jen několik výhrad:

- Legendy k obrázkům by měly být umístěny pod obrázky.
- Odkazy na literaturu v textu by měly být uvedeny buď chronologicky, nebo dle abecedy, nikoliv však nahodile (viz strany 68, 69, 71, 75) – jelikož se týká zejména kapitoly Diskuse, domnívám se, že se jedná jen o „nestíhání úprav“ v rámci rychlého dopisování práce.
- V obsáhlém výčtu literatury postrádám zásadní práci Adl et al. (2012) – namísto starší Adl et al. (2005) – týkající se současné taxonomie eukaryot, tím pádem i současné klasifikace studovaných protist, která je rozebírána v kapitole Úvod.
- Komůrka pro počítání buněk není Bürknerova, ale Bürkerova (str. 51).
- Zaujalo mě slovní spojení „křivka jako přímka“ nebo „hodnota dosáhla hodnoty“ na str. 61.
- Na straně 61 chybí slovo „kopie“ v názvu kapitoly i tabulky. Je rozdíl mezi „počtem genů“ a „počtem kopií genů“.
- Na straně 72 byl patrně zamýšlen *Encephalitozoon*, nikoliv *Enterocytozoon (cuniculi)*; podobně na straně 76 zase *Enterocytozoon* (nikoliv *Encephalitozoon*) *bieneusi* genotyp D.
- Ještě se neubráním dotazu - proč kapitola Materiál a Metody nepokračuje tabulkou č. 10, jak by se dalo logicky očekávat, ale opět tabulkou č. 6 (která již existuje pro jiná data na str. 25)? Celé číslování tabulek je pak posunutě.

K práci mám následující dotazy:

1. V Materiálu a Metodách uvádíte, že od některých jedinců orangutanů byl trus odebírán opakovaně. Byli studovaní jedinci nějak označeni, nebo jakým způsobem byli od sebe vzájemně rozeznáváni?

2. Jakým způsobem/postupem byl před vlastní izolací DNA „odpařen alkohol ze vzorků trusu“?
3. Proč jste pro primární PCR reakce používala 5 μ l DNA u giardií, zatímco u ostatních parazitů pouze 2 μ l DNA?
4. V Cílech práce uvádíte, že „vliv rostlinných extraktů na ostatní parazitická protista byl řešen v rámci dalších prací.“ O jaká „ostatní“ parazitická protista se jednalo?
5. Předpokládali jste, že by DMSO mohl nějak ovlivnit průběh infekce? Nebo jeho účinky v této souvislosti nejsou známy?
6. Jak si vysvětlujete přítomnost nejvyššího počtu kopií genu pro β -aktin v 1 g tkáně v srdci? Čím mohou být rozdíly mezi jednotlivými orgány způsobeny?
7. Máte nějakou hypotézu pro závěr č. 5? („Extrakt z *Shorea sumatrana* a *Piper betle* významně zvýšily absolutní počet spor *E. cuniculi* v orgánech mimo trávicí trubici ve srovnání s kontrolními léčenými skupinami“). Čím si vysvětlujete výrazné rozdíly v počtu spor v různých orgánech a u různých pokusných skupin (Tabulka 12 str. 64)?
8. Z výsledků je zřejmé, že jistý antiparazitární efekt opakovaně vykazuje i „kontrolní“ extrakt z *Arabidopsis thaliana* (nízký průměrný počet vyloučených spor 20.-34. DPI; nízký průměrný počet spor v orgánech ve srovnání s kontrolní skupinou; polovina studovaných orgánů – žaludek, duodenum, ileum, kolon, ledviny, srdce – zcela bez nálezu spor). V některých případech je tento efekt často srovnatelný s *Diospyros sumatrana*. Shrnutí tak významného zjištění bych rovněž očekávala v kapitole Závěr. Neplánujete *A. thaliana* také zařadit do navazujících experimentů?

Předloženou diplomovou práci považuji za velice zdařilou, jednoznačně ji **doporučuji** k obhajobě a navrhuji hodnotit stupněm „výborně“.

V Českých Budějovicích, 15. ledna 2016

Kvičera!
MVDr. Jana Kvičerová, Ph.D.