

Oponentský posudek na diplomovou magisterskou práci Bc. Lucie Tiché

Citlivost spirochet komplexu *Borrelia burgdorferi* sensu lato k lidskému komplementu: infekční potenciál vybraných druhů

Práce analyzuje mortalitu několika druhů borélií v závislosti na inkubaci s lidským sérem. Práce je spíše menšího rozsahu, což ale samo o sobě nepovažuji za nedostatek, pokud je stručnost vyvážená kvalitou. Členění práce odpovídá požadavkům a jednotlivé oddíly jsou rozsahem vyvážené. Nyní k jednotlivým oddílům.

Úvod je podle mého názoru nejlépe zpracovanou částí. Autorka předkládá srozumitelnou a stručnou rešerši o různých původcích Lymfské boreliózy a různých symptomech, které závisí na druhu borélie. Následuje popis nemoci a vliv komplementu na infekční potenciál, průběh nemoci a popis interakce borélie-hostitel.

K úvodu mám jen pár poznámek. Na straně 9 jsou vyjmenovány prozánětlivé cytokiny, ale jsou uvedeny jako protizánětlivé. Věřím, že šlo o přehlédnutí. **Dále bych se chtěl zeptat, jak se změní citlivost borélií k dalším složkám imunity po inkubaci s komplementem?**

Cíle práce nejsou definovány jasně, zejména první, druhý a čtvrtý bod. Literární studie k tématu není cílem práce, stejně jako výčet použitých metod. Čtvrtý bod nezní jako cíl. Cílem je zde vytvořit model životaschopnosti (v práci jsem takový model nenašel, **co je v tomto případě myšleno modelem**).

Metody a materiál jsou popsány dostatečně, pouze u průtokové cytometrie by mě zajímalo nastavení jednotlivých filtrů, především forward scatter. proč u PCR probíhá denaturace v každém cyklu 5 minut. **Není to příliš dlouho? Je to kvůli specifickým vlastnostem spirochetální DNA?**

Výsledky mají nejvíce slabin. Dlouho jsem ve výsledcích hledal, k čemu byla použita PCR, jejíž popis v metodách zabírá 2 stránky. Našel jsem jednu zmínku na str. 23. Tady mi přijde nepoměr popsané metody a získaného výsledku. Popis identifikace a čistoty borélií v kulturách by si zasloužil více prostoru ve výsledcích.

Str 24 uvádí, že bylo testováno 1200 reakcí, tabulka uvádí celkem 120, **které číslo je správné?** Bylo skutečně použito 10 různých sér od každého z 10 pacientů v každé ze 12 skupin? Popis nejasný.

Nyní největší slabina: Přestože bylo k dispozici minimálně 10 vzorků v každé skupině, není provedena žádná statistika. A přestože není provedena statistika, jsou zde tvrzení, že „mortalita borélií...byla nižší u žen než u mužů.“ **Během prezentace musí být všechny prezentované výsledky statisticky vyhodnoceny a grafy musí obsahovat chybové úsečky, ať již standardní odchylky nebo standardní chybu průměru.** Ve vědecké práci, kde se pracuje s průměrnými hodnotami, je naprosto nezbytné provádět statistické vyhodnocení!

U testu citlivosti ke komplementu by mě zajímalo, **zda byla použita negativní kontrola s inaktivovaným sérem a k čemu je taková kontrola nutná?**

Diskuze je celkem pečlivě provedena. Zde mám dvě otázky: Jak relevantní je 1% nebo 4% mortalita borélií při interakci s komplementem pro jejich infekčnost? Osobně mi přijde taková mortalita zanedbatelná, souvisí to tedy se zvýšením citlivosti k jiným složkám imunity (viz první otázka z úvodu)?

Na začátku třetího odstavce se autorka dopouští velmi odvážné spekulace. Dle mého názoru zde získané výsledky nemohou vysvětlit rychlé rozšíření Lymfské boreliózy po celém světě. Na str. 29 jsem

nepochopil čtvrtý odstavec. Jsou uváděny dvě studie, nepochopil jsem, jakou z těchto studií výsledky této práce potvrzují.

Závěr: Odstavec a) tvrdí, že všechny testované borélie jsou potenciálně infekční, že LB může být způsobena všemi deseti testovanými druhy. Existují druhy borélií, které jsou ke komplementu mnohem (řádově) citlivější?

Body e) a f) nejsou potvrzeny výsledky, protože chybí statistika, viz. poznámky k výsledkům.

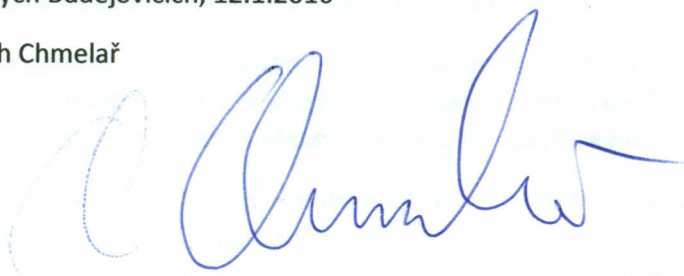
Celkově má magisterská práce Bc. Lucie Tiché svoje světlé a stinné stránky. Oceňuji práci s literaturou a orientaci v tématu. Úvod a diskuze jsou až na detaily v pořádku, metodika je popsána dostatečně. Co však je bohužel velkým nedostatkem, je zpracování výsledkové části. Vzhledem k množství získaných dat bylo možné provést kvalitní statistickou analýzu a výsledky prezentovat mnohem přehledněji. Výsledky sekvenace a analýza čistoty populací by si zasloužila více prostoru.

V závěru a diskuzi pak autorka vyvozuje závěry, které nejsou podle mě adekvátní významu získaných výsledků. To je spíše upozornění pro případ psaní publikace, kde je třeba mnohem kritičtější přístup.

Předkládanou práci doporučuji k obhajobě a navrhuji Lucii Tiché známku 2-.

V Českých Budějovicích, 12.1.2016

Jindřich Chmelař



Oponentský posudek magisterské diplomové práce

Autorka: Bc. Lucie Tichá

Název: Citlivost spirochet komplexu *Borrelia burgdorferi* sensu lato k lidskému komplementu: infekční potenciál vybraných druhů.

Školitelka: Maryna Golovchenko, MSc

Vedoucí práce: Nataliia Rudenko, PhD

Fakultní garant: Prof. RNDr. Libor Grubhoffer, CSc.

Oponentský posudek vypracoval: RNDr. Radek Šíma, PhD., Parazitologický ústav BC AVČR, České Budějovice

Magisterská diplomová práce Lucie Tiché se zabývá potenciálně zajímavým tématem citlivosti různých druhů borrelií k lidskému komplementu a navazuje tak na svoji bakalářskou práci zaměřenou na testování citlivosti borrelií ke komplementu nejrůznějších skupin živočichů. Magisterská práce má 42 stran a dle zvyklostí je členěna na úvod, cíle práce, materiál a metody, výsledky, diskuzi, závěr a seznam použité literatury. Práce je svým rozsahem spíše stručnější, ale vzájemný poměr jednotlivých částí je i tak přiměřený a odpovídající nárokům na magisterské diplomové práce na Přírodovědecké fakultě JU.

Úvod čítá 10 stran textu, autorka zde shrnuje základní poznatky týkající se rozšíření Lymeské borreliózy ve světě, podrobně se věnuje popisu původce onemocnění, zpracovává zde dostupné informace o infekčním potenciálu různých druhů borrelií pro člověka, popisuje průběh onemocnění u člověka, v dalších podkapitolách se potom věnuje kompatibilitě jednotlivých druhů borrelií s komplementem rezervoárových zvířat a interakcím borrelií s hostiteli. Celý úvod má logickou strukturu, dostatečně seznamuje čtenáře s řešenou problematikou, práce s literárními zdroji je na dobré úrovni, k této části nemám zásadní výhrady. Vytkl bych pouze použití převzatých, dosti nekvalitních obrázků a příliš stručné legendy k obrázkům.

Cíle práce jsou stručné, jasně definované a konkrétní.

Kapitola **Materiál a metody** je sepsaná na 9 stranách, je přehledně členěná, jednotlivé metody jsou vysvětleny dostatečným způsobem. K této kapitole bych měl pouze několik připomínek a dotazů.

1. V kapitole 3.2.2. je popisována příprava séra z krve testovaných pacientů. Ze stručného popisu metody to vypadá, že autorka připravovala spíše plazmu, než sérum. Prosím o podrobnější vysvětlení, jak bylo sérum připravováno a do jakých odběrových zkumavek byla odebírána krev. (**prosím o komentář při obhajobě**)
2. V podmínkách amplifikační reakce na straně 16 je zřejmě chyba, nezdá se mi, že denaturace DNA v průběhu amplifikace trvala 5 minut.
3. V metodách je dále několik drobných chyb. Např. správně je SYBR Green, ne SyberGreen (str. 16), GeneRuler, ne Gene Ruller (str. 17).

Výsledky předložené práce jsou shrnuty na 7 stranách, včetně 5 obrázků a 6 tabulek. V porovnání s předchozím textem musím bohužel konstatovat, že tato kapitola tvoří slabší část magisterské práce. Výhrady mám zejména k provedení a prezentaci získaných výsledků. Autorka testovala citlivost deseti druhů borrelií k lidskému komplementu. Ze získaných dat se potom snažila definovat rozdíly mezi skupinami pacientů na základě věku a pohlaví a určit tak skupinu s nejvyšším rizikem nákazy. Postrádám zde jakékoliv statistické zpracování dat, bez kterého výsledky nemají žádnou vypovídací hodnotu. Např. na straně 25 autorka tvrdí, že mortalita borrelií se ženským sérem je nižší, než mortalita borrelií s mužským sérem. Tento závěr vyvozuje na základě prostého porovnání zprůměrovaných hodnot z tabulky 7. Na první pohled je přitom patrné, že hodnoty v tabulce mají v rámci jednotlivých skupin celkem široký rozptyl. Bez směrodatných odchylek a statistického zhodnocení nelze z těchto dat

vyvozovat žádné závěry. Podobně by se dalo pokračovat u všech následujících tabulek, grafů a závěrů, které bez statistiky postrádají smysl. **(bylo by vhodné toto doplnit při obhajobě)**

Z předložených výsledků plyne, že borrelie nejsou lidským komplementem zabíjeny, nebo jen málo, jedná se tedy v podstatě o negativní výsledky. Presentace takových výsledků je vždy ošemetná a musí být podpořena kvalitními kontrolami potvrzujícími spolehlivost použitých metod. Bez nich nejde rozlišit, zda se jedná opravdu o negativní výsledek, nebo zda nefunguje použitá metoda. Takové kontroly v práci ale postrádám. Chybí zde například kontrola, zda byl komplement v připravených sérech funkční. Dále by bylo vhodné do pokusů zařadit jako pozitivní kontrolu sérum zvířete (např. kráva) u kterého je známo, že borrelie zabíjí a potvrdit tak spolehlivost použité metody.

Dále bych vytkl formální nedostatky, především zmatek v číslování tabulek a obrázků. Ve výsledcích se objevuje dvakrát tabulka č. 4, chybí zde tabulka č. 8, obrázky jsou zcela nelogicky číslovány od 1 do 11 a potom znovu od 6 do 8. Legendy obrázků a tabulek nejsou dostatečně podrobné (měly by konkrétně vysvětlovat, co čtenář na obrázku vidí) a mnohdy tedy není zcela jasné, co daný obrázek ukazuje (např. obrázky 10 a 11). Tabulka č. 6 neobsahuje žádná důležitá data a je tedy zbytečná.

Diskuzi jsou věnovány necelé 3 strany textu. Autorka porovnává svoje výsledky s literárními údaji i s výsledky pocházejícími ze školící laboratoře. Práce s odbornou literaturou je na dobré úrovni, připomínky bych měl opět k vyvozovaným závěrům, které bez statistiky nelze s jistotou tvrdit.

Závěrečné hodnocení: Předloženou magisterskou práci doporučuji i přes její nedostatky k obhajobě. Navrhuji známku 2-3, závěrečné hodnocení bude záviset na kvalitě ústní prezentace. Je zřejmé, že se autorka během svého studia seznámila s celou řadou laboratorních technik a bude tak ze školy odcházet dobře připravená pro práci v nejrůznějších typech diagnostických laboratoří. Pokud by se ale rozhodla pokračovat ve vědecké kariéře, bude potřeba výrazně zapracovat na provedení experimentů a jejich správném vyhodnocení.

Otázky oponenta:

1. Na straně 2 autorka uvádí, že borrelie jsou G- bakterie, což není tak úplně pravda. Prosím uveďte některé zásadní znaky, které odlišují borrelie od typických G- bakterií.
2. Na straně 6 se píše, že borrelie mohou být na člověka přeneseny všemi stádii klíštěte (larva, nymfa, dospělec). Prosím vysvětlete, jak se borrelie v přírodě přenáší a jaké stádium představuje pro člověka největší nebezpečí.
3. Ve výsledcích jsem vytýkal, že chybí kontrola na funkčnost komplementu. Mohla byste prosím navrhnout způsob, jakým by bylo možné změřit a otestovat aktivitu komplementu?

V Českých Budějovicích 14.1.2016

Radek Šíma