

Oponentský posudek na magisterskou diplomovou práci Bc. Nikoly Ludvíkové „Antivirotické a antibakteriální účinky biologicky aktivních látek z přírodních zdrojů a jejich potenciální využití proti klíšťaty přenášeným patogenům“

Práce se zabývá zhodnocením antivirových a antibakteriálních účinků přírodních rostlinných substancí zastoupených resveratrolem a deriváty adamantanu. Pro experimenty *in viro* byl vybrán virus klíšťové encefalitidy, *Borrelia burgdorferi* a několik zástupců G+ a G- bakterií. Po stanovení maximálních tolerovaných koncentrací použitých látek pro glioblastomovou buněčnou linii použitou pro množení viru KE, byl prokázán antivirový účinek resveratrolu, který byl nejvyšší při profylaktickém podání. Deriváty adamantanu neovlivňovaly významně replikaci viru KE. Resveratrol též inhiboval růst bakterií *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis* a *Escherichia coli*. Nebyl prokázán vliv na růst spirochét Lymské boreliózy.

Práce obsahuje poměrně rozsáhlý literární přehled (30 stran), který je věnován biologicky aktivním látkám přírodního původu, resveratrolu a adamantanu a flavivirům a bakteriím přenášeným klíšťaty. Podle mého názoru je přehled příliš rozsáhlý, zbytečně se věnuje na příklad metodám izolace biologicky aktivních látek z rostlin, nebo stavbě hroznů vinné révy. Literární přehled je podpořen zhruba 180 citacemi, což je počet úctyhodný. Nejsm si zcela jist, zda v magisterské práci citovat učebnice nebo skripta a už vůbec ne populární a jistě zajímavou knížku M. Kerlese „Člověk a klíště“.

Kapitola Materiál a metody (13 stran) je psána dostatečně podrobně, někde až příliš (proč psát sumární vzorec trypanové modři?). Na druhé straně chybí informace o označení a původu glyoblastomové linie (lidská nebo zvířecí?), v popisu pasáží buněk je vynechána trypsinizace (str. 32). Na str. 37, 2. odstavec se mluví o uložení panelů do CO₂ inkubátoru a koncentrace CO₂ je uvedena až později.

Při přípravě vzorků pro průtokovou cytometrii ke stanovení poměru živých a mrtvých buněk byly buňky před trypsinizací opláchnuty 1% roztokem BOFES. Tím ale mohly být odmyty mrtvé buňky. Byla si toho autorka vědoma?

Str. 39 dole: v případě MOI je lepší mluvit o počtu PFU na buňku a ne o počtu virionů, protože ty nikdo nespočítá.

Str. 41. Poněkud mi unikl smysl použití qRT-PCR, kdy byla virová RNA stanovována v glyoblastomových buňkách, zatím co virus byl plakovou titrací stanoven v kultivačním mediu z infikovaných buněk.

Kapitola výsledky je spojena s diskusí, což není podle mého názoru ku prospěchu věci. Výsledky spojené s diskusí se používají pouze u kratších publikovaných sdělení, zatím co rozsáhlejší výsledky se diskutují zvlášť. Tato kapitola trpí zejména zcela nedostatečnými legendami u grafů a tabulek, takže čtenář musí pracně hledat v kapitole Materiál a metody co které označení (PC, NC, deriváty adamantanu atd.) znamená.

Str. 47. Proč nejsou uvedeny hodnoty životnosti buněk pro vyšší koncentrace resveratrolu?

Str. 48. Proč nebyly testovány vyšší koncentrace derivátů adamantanu?

Na str. 51 bych se chtěl zeptat, jak je definována inhibiční koncentrace (IC), jak je uváděna u resveratrolu pro jednotlivé viry.

Na str. 51 je u IC resveratrolu pro enterovirus 71 uvedena chybná citace (má být Zhang et al. 2015).

Na str. 57, tabulka XVII chybí u resveratrolu koncentrace.

V celé diplomové práci chybí seznam zkratk.

K autorce mám otázku, která se týká eventuálního testování antivirotik na zvířatech. Co je to terapeutický index a jak byste ho stanovila?

Závěr:

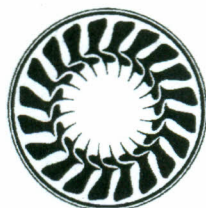
Nikola Ludvíková předložila poměrně zdařilou práci psanou dobrým vědeckým jazykem. Podařilo se jí jako první prokázat inhibiční účinek resveratrolu na replikaci viru KE. Nepochybně by stálo za to, dále se zabývat mechanismem účinku této látky a zhodnotit jeho efekt *in vivo*. Bohužel kvalitu práce poněkud snižují nedostatečné popisy grafů a tabulek a příliš stručná diskuse, která se poněkud „rozplynula“ v kapitole Výsledky.

Práci doporučuji k obhajobě a hodnotím „velmi dobře“.

V Českých Budějovicích 17. 5. 2016



Prof. RNDr. Jan Kopecký, CSc.



MSc. Rudenko Nataliia, Ph.D.
Biologické centrum AV ČR, v.v.i.
Parazitologický ústav
Branišovská 31
370 05 České Budějovice

Oponentský posudek na magisterskou práci Bc. Nikolý Ludvikové

„Antivirotické a antibakterální účinky biologicky aktivních látek z přírodních zdrojů a jejich potenciální využití proti klišťaty přenášeným patogenům“

V práci autorka řeší problematiku využití resveratrolu a derivátu adamantanu proti klišťaty přenášeným patogenům. Jako cíle si autorka navrhla určení tolerovaných koncentrací vybraných látek při použití v *in vitro* systému a to s buněčnou linií glioblastu, detekci antivirotických účinků látek proti viru klišťové encefalitidy a antibakteriálních účinků proti standardním kmenům bakterií a vybraným kmenům spirochét komplexu *Borelie burgdorferi* sensu lato.

Práce má 75 stran a je členěna na kapitoly literárního úvodu, cíle práce, materiály a metody, výsledky a diskuzi, závěr a seznam literatury a svým rozsahem odpovídá nárokům na magisterskou práci.

K formální stránce práce mám tyto připomínky:

Sepsaná práce obsahuje menší chyby a nepřesnosti:

„Annotation“ v angličtině, řádek 6. „...using flow cytometry and subsequently“. Co to znamená?

V Obsahu práce jsou neuvedené části které se vyskytují v textu, například 2.1.1.1, 2.1.1.2 a 2.1.1.3.

V Obsahu podle mě některé názvy nejsou přesné, například 2.1 Biologické látky z rostlin a 2.5 Biologicky aktivní látky z přírodních zdrojů. ... Přírodní zdroje zahrnují rostliny, nebo ne?...

Chyby jsou v citované literatuře, několik citací chybí: str. 1 Negi 2010; Farzaneh a Carvalho, 2015; str.2- Schrutz, 1993.

Nepřesnosti: str. 3 pod 2.1.1 Antioxidanty... jsou najednou 2.1.1.1 Izolace biologicky aktivních látek. Stále tak části 2.1.1.2 a 2.1.1.3 také nepatří pod 2.1.1. Antioxidanty

U jednotlivých kapitol mám tyto připomínky:

2. Literární přehled...obsahuje 28 stran. Podle mě je hodně členěna na malé odstavce, některá z nich nemají nic společného s cílem práce a jsou totiž zbytečná. Například 2.6.1.1 Virus klišťové encefalitidy - třeba ano, ale léčba a prevence TBE jsou zbytečné. Takových částí je více.

2.3.2.1 Polyfenolické látky

„Polyfenoly dělíme na fenolové kyseliny, ligniny, flavonoidy a stilbeny“. Není jasné proč dále popisujete jen flavonoidy a stilbeny, a další dva prostě vynecháte. Je k tomu nějaké objasnění?

2.4.5.2 Antivirová aktivita resveratrolu

...téměř ve všech studiích resveratrol způsobil významný ústup virové infekce, s výjimkou hepatitidy C, kde byly progresse onemocnění po jeho podání zhoršeny... Zajímalo by mě, zda je tomu nějaké vysvětlení?

...stejná věta je v rozporu s větou na str. 51 kde se píše ze...:“Doposud byl antivirotický účinek resveratrolu prokázán u mnoha virů např. u viru hepatitidy C...”

2.7.1. Klistaty prenasene bakterie: predstaveni jsou *Borrelia burgdorferi*, *Rickettsia prowazekii* a *Francisella tularensis*. Nespravne pouziti nazvu *Borrelia burgdorferi*. Pouziti toho to jmena odkazuje na druh *sensu stricto*. V praci by melo byt uvedeno *B. burgdorferi sensu lato*.

Proč nejsou zmíněna další bakterie, jako například anaplasma nebo spirochety návratné horečky???

Přece ani *Rickettsia prowazekii* ani *Francisella tularensis* nebyli zapojeni do pokusu a při tom byly popsáné...

2.7.1.1. *Rickettsia prowazekii*???

Proč právě ona? A co další rickettsii, je jich okolo 12 různých druhu?

2.7.1.3 *Borrelia burgdorferi* -podle textu usuzuji ze jde o *sensu lato* komplex. Je popsáných už 21 druhu, ne 20. Dále, ne 3 ani ne 6 ale 10 druhu dnes jsou asociovány s LB u lidí. Poslední odstavec části, str.28 objevují se druhy původci návratné horečky jako pokračování části. Tě ale nepatří ke skupině *B. burgdorferi sensu lato*.

2.7.2 Lymska borelioza 2. odstavec:“*Borelie* neprenasi jen dospela klistata ale i larvy a nymfy..“ toto nepatří do rozdílu LB. Dále, larvy *I. ricinus* přenášet spirochéty nemohou pokud nebyl potvrzen transovarialný přenos. Ten u komplexu *B. burgdorferi sensu lato* potvrzen nebyl.

Úvod obsahuje obrovské množství informace (občas i zbytečné) a kvůli tomu objemu postrádá se informativní hodnota některých částí, v některých odstavcích informace je spíše povrchní.

Material a metody

str. 34 *Borrelia burgdorferi* s.l. Proč byly vybrány právě tyto 5 kmenu borelie. *B. garinii*, *B. afzelii*, a *B. burgdorferi* s.s. rozumím, jsou to druhy které se vyskytují nejvíce v Evropě (i když B31 je americký kmen) a jsou asociované s LB, ale proč právě *B. finlandensis*?? Je k tomu nějaké vysvětlení?

str. 37-38 Proč je tak velký rozdíl v testovaných koncentracích resveratrolu (3,125-100 mikrogram/ml) a u derivátu adamantanu - (15.625-500 ng/ml). Není to vysvětlení proč u resveratrolu se podařilo prokázat nějaké účinky a u derivátu adamantanu ne?

Totéž se týká koncentraci DMSO ve vzorcích,- 0.1% oproti 0.0025%. Prosím o vysvětlení.

Vysledky a diskuze.

V případě prací Nikoloy nepovazují nápad sepsání společné části Výsledky a Diskusi za dobrý. Diskuse výrazně převládá a vlastní výsledky se ztrácí v probíraných cizích.

Výsledky a diskuze dále: resveratrol se rychle rozpadá při uschování na +4 °C. Testovali jste jak dlouho může vydržet stabilní na -20°C? Jak dobře snáše opakované rozmrzení a zmrazování?

Seznam použité literatury je obdivuhodný, má necelých 15 stránek, a při tom chybí v něm některé citace.

Závěr: podle mne by bylo lepší vůbec nezahrnovat do práce negativní výsledky testování derivátu adamantanu a nepovedené pokusy na boreliích, proto že jde o metodickou chybu použitého postupu. Nedostatek času na opakování pokusu, bohužel, nemůže být přijatelným vysvětlením.

Na závěr by chtěla říct že autorka zvládla základní metody nezbytní pro dosazení cílů prací. Práce je velice zajímavá a jako začátek dalšího většího projektu dost slibná. Podařilo se prokázat antibakteriální účinky resveratrolu a inhibice růstu viru TBE, což ještě nebylo prokázáno nikým jiným.

Přes všechny připomínky jsem přesvědčena, že předložená práce splňuje nároky Přírodovědecké fakulty JU na magisterskou práci, proto ji doporučuji k obhajobě jako jeden z předpokladů udělení titulu Magistr. Navrhuji známku 2 (hodně ale závisí na obhajobě).

V Českých Budějovicích dne 20. 5. 2016

Natalia Rudenko