Přírodovědecká fakulta
Faculty of Science

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
University of South Bohemia in České Budějovice

Oponentský posudek na magisterskou diplomovou práci Markéty Rezkové
„Pokus o charakterizaci proteinu vázajícího TNF-α ve slinách klíštěte *Ixodes ricinus*"

Markéta Rezková předkládá diplomovou práci zabývající se interakcí slin různých druhů klíšťat s myším TNF. Skutečnost, že sliny *Ixodes ricinus* nějakým způsobem snižují koncentraci biologicky aktivního TNF, byla v laboratoři prof. Kopeckého popsána před více než deseti lety. Od té doby se výzkum v této oblasti bohužel příliš neposunul; i proto považuji zvolené téma za adekvátní a hodné pozornosti.

Předložená práce má obvyklé členění a přiměřený rozsah. V literárním úvodu obsahuje veškeré relevantní informace bez zbytečných balastních pasáží. Cíle práce jsou jasně formulované, v této souvislosti bych osobně zvolila jiný název celé práce; ten stávající může působit zbytečně poraženecky. Metodika je jasná a dostatečně podrobná, ve výsledkové části mám drobnou připomínku k designu sloupcových grafů: Pokud se jedná o černobílý tisk, je obvyklejší (a přehlednější) použít vzorkovou výplň (jako na obr. 19) spíše než stupně šedi.

Předložená práce je psána dobrou češtinou, obsahuje minimální množství překlepů a gramatických chyb; opakovaně se objevují snad jen chyby v interpunkci (čárky uvnitř věty). Pozůstatky anglické větné stavby a anglické slovní zásoby se v práci téměř nevyskytují, v tomto kontextu si dovoluji upozornit pouze na správnou formu slova rozpustný: „solubilní", nikoliv „solubní" (str. 17) a anglicismus „band" při hodnocení western blotu. Ve výčtu rodových a druhových jmen klíšťat stačí po prvním použití rodového jména „*Ixodes*" psát pouze „*I.*" Několik drobných připomínek mám ke způsobu citování použité literatury. Předně citace Mareš *et* Kopáček 2008 je populárně naučný článek z časopisu Vesmír a jako takový je nevhodný jako primární zdroj informací o složkách klíštěcích slin. Latinská spojka „*et*" není zkratkou, tudíž se píše bez tečky (např. Anderson *et* Valenzuela 2008). Není zvykem v textu uvádět název citované publikace (např. na str. 20), stačí jméno autora a rok vydání. Pokud považujete název práce z nějakého důvodu za zásadní, doporučuji použít tzv. poznámku pod čarou. Pravidla českého pravopisu (bohužel) nařizují přechylování příjmení u žen; pokud je např. citace Flynn et al. (1995) použita ve větě jako podmět, pak je třeba psát „Flynn**ová** a kolektiv infikovali myši..." (str. 18).

Tolik k formální stránce. Na autorku mám následující dotazy a faktické připomínky:

1) V závěru kapitoly 1.2 píšete o vychýlené rovnováze mezi Th1 a Th2 cytokiny. Co je známo o působení klíštěcích slin na ostatní subpopulace pomocných T lymfocytů (Th17, Th9, Treg)?
2) Str. 7: Prvok *Theileria annae* přenášený klíštětem *I. hexagonus* byl v roce 2015 reklasifikován jako *Babesia vulpes*.
3) Kapitolám 1.6 a 1.7 by prospělo souhrnné schéma zobrazující ve zkratce komplikované procesy vazby TNF na receptory a následné aktivace signálních drah.

Přírodovědecká fakulta
Faculty of Science

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
University of South Bohemia in České Budějovice

4) Proč jste pro statistickou analýzu použila nepárový t-test? Pokud je mi známo, Studentův t-test se doporučuje pouze pro porovnání dvou skupin. Ve Vašem případě jste většinou analyzovala 4 skupiny (bez slin a 3 různé koncentrace slin). Domnívám se, že v tomto případě je správnější použít jednocestnou analýzu variance doplněnou vhodným *post-hoc* testem.
5) Přestože sliny všech testovaných zástupců rodu *Ixodes* vykazovaly anti-TNF aktivitu, *I. ricinus* fungoval nejlépe. Mohl podle Vás hrát roli fakt, že chovy *I. persulcatus*, *I. hexagonus* a *I. scapularis* se z pochopitelných důvodů obnovují mnohem méně často než chov *I. ricinus*? Nebyl chov zdegenerovaný? V jakém stavu se v době Vašich pokusů nacházely chovy ostatních druhů, u kterých jste nedetekovala žádnou anti-TNF aktivitu?
6) Ad obr. 15 a 18: Domnívám se, že v těchto případech by bylo lepší použít jako pozitivní kontrolu SGE z *I. ricinus*, nikoliv sliny, zejména s ohledem na podíl strukturních proteinů v SGE.
7) Uveďte příklady konkrétních léčiv založených na blokaci/inhibici TNF používaných v klinické praxi.

Závěr: Diplomová práce Markéty Rezkové přinesla nové originální výsledky, které jsou podány srozumitelným a vcelku čtivým způsobem. I když nebyl TNF-vázající protein identifikován, podařilo se do projektu vnést alespoň trochu nového světla. Markéta prokázala schopnost kriticky zhodnotit získaná data a uvést je do souvislostí. Výše zmíněné připomínky se týkají spíše formální stránky předloženého spisu a nemají podstatný vliv na celkový dojem. Magisterskou diplomovou práci Markéty Rezkové **doporučuji k obhajobě**, neboť splňuje všechny požadavky kladené na závěrečné práce na Přírodovědecké fakultě Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích.

V Českých Budějovicích 12. května 2017

RNDr. Helena Langhansová, Ph.D.

Branišovská 1760 370 05 České Budějovice, Česká republika T/ +420 387 776 201 F/ +420 387 776 226 www.prf.jcu.cz

VÚVeL VÝZKUMNÝ ÚSTAV VETERINÁRNÍHO LÉKAŘSTVÍ, v. v. i.

Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v. v. i.,
Veterinary Research Institute
Hudcova 296/70
621 00 Brno

vri@vri.cz
www.vri.cz

Sekretariát:
+420 5 3333 2501

Operátor:
+420 5 3333 1111

Fax:
+420 5 4121 1229

Oponentský posudek na magisterskou práci

Autorka: **Bc. Markéta Rezková**
Název práce: **Pokus o charakterizaci proteinu vázajícího TNF-α ve slinách klíštěte *Ixodes ricinus***

Předkládaná diplomová práce se zabývá studiem proteinu vázajícího TNF-α, který je součástí slin klíštěte obecného. Práce má celkem 55 stran a je členěna na kapitoly: Úvod, Cíle práce, Materiál a metody, Výsledky, Diskuze, Závěr, Přehled použitých zkratek, Literatura a Obrázky. V těchto oddílech autorka popisuje a diskutuje získaná data formou vědeckého sdělení. Autorka v rámci experimentální práce využila řadu metod zahrnujících odběr slin klíšťat, přípravu SGE, ELISA pro detekci cytokinů, western blotting a dospěla k zajímavým výsledkům. Pozitivně hodnotím zejména průkaz anti-TNF aktivity ve slinách dalších druhů klíšťat. Získaná data mohou sloužit jako podklad pro vznik vědecké publikace.

K práci mám následující připomínky a ***dotazy***:

V práci se bohužel občas vyskytují neobratné formulace a chyby jako např.:
Poděkování: ...**PhD.**, **PhD** ... (Ph.D.)
Obsah a str. 27: **WESTERN BLOTTING** ... (malá písmena)
str. 2: ... **et.** ... (et)
str. 5: Domnívám se, že v odborném textu by se neměly vyskytovat odkazy na internetové stránky typu wikipedie (Obr. 1, 2, 3, 4 a další)
str. 5: ... **převlékání** nastává ... (přeměna)
str. 5: ... záhy **přitom** hynou ... (potom)
str. 5: Při **lovu** aktivně vyčkává ... (hledání hostitele)
str. 6: Obr. 2 je označen jako **Obr. 1**.
str. 7: Obr. 3: Vyznačení výskytu klíštěte na mapě neodpovídá popisu v textu.
str. 13: Životní strategie *Dermacentor reticulatus* **je téměř ideální**.
str. 14: Obr. 10: Vyznačení výskytu klíštěte na mapě neodpovídá popisu v textu.
str. 15: ... vysoce životaschopný a **agresivní** druh. (o klíštěti)
str. 16: **Pro úplnost bych ještě zmínila**, ... (nadbytečná věta v úvodu)
str. 20: ... **death** doména ... (doména smrti)
str. 24 a 25: podle **Bradforda** (Bradfordové)
str. 42: je míra inhibice ... **relativně stejná**.
str. 41 exprese MHC molekul není v práci Koník a kol. (2006) řešena, měla by být citována původní práce.
str. 41: Citace prací v textu se neuvádí se zněním názvu článku.

Str. 5: Autorka v práci uvádí, že dospělí samci potravu nepřijímají. Je tomu skutečně tak?

Str. 15: Je známo, jaký antigen ve slinách klíštěte* Amblyoma americanum *způsobuje vznik alergie na červené maso u lidí a k čemu tento antigen klíštěti slouží?

Str. 16: Autorka uvádí, že nízká koncentrace TNF-α vede ke kachexii. Není tento proces spojen s vysokou koncentrací TNF-α?

Str. 24: Jak kapka PBS zvětší vnitřní struktury klíštěte? Pokud je myšleno optické zvětšení, přepokládám, že pitvy se prováděly pod binokulárním mikroskopem.

VÚVeL VÝZKUMNÝ ÚSTAV VETERINÁRNÍHO LÉKAŘSTVÍ, v. v. i.

Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v. v. i.,
Veterinary Research Institute
Hudcova 296/70
621 00 Brno

vri@vri.cz
www.vri.cz

Sekretariát:
+420 5 3333 2501

Operátor:
+420 5 3333 1111

Fax:
+420 5 4121 1229

Str. 38: Obr. 20: Výsledky imunodetekce jsou rozporuplné. I já se přikláním k hypotéze, kterou autorka později uvádí v diskuzi, že protein o velikosti 90 kDa bude spíše vázat protilátku. Navíc předpokládaná velikost anti-TNF-α proteinu by dle publikace Koník a spol. (2006) měla být 23 kDa. Tato informace by měla být součástí diskuze.

Str. 39. a 43: Autorka uvádí, že rychlost inhibice TNF je vysoká (s. 39) a pravděpodobnost obnovení procesu vazby při 4°C je zanedbatelná (s. 43). Byla testována schopnost vazby anti-TNF-α faktoru při 4°C? Pokud ne, tak nejsou tato tvrzení ničím podložena.

Autorka se při vlastní experimentální práci seznámila s celou řadou laboratorních metod. Sepsáním předkládané diplomové práce prokázala schopnost samostatné práce s vědeckou literaturou.

Práci **doporučuji k obhajobě** a hodnotím ji stupněm **velmi dobře**.

V Brně 15. 5. 2017

RNDr. Jiří Salát, Ph.D.