

Oponentský posudek na disertační práci

Ing. Libora Večerka

předložené pod názvem:

„Analýza vybraných dědičných poruch zdraví skotu“

Předkládaná disertační práce Ing. Libora Večerka s názvem „Analýza vybraných dědičných poruch zdraví skotu“ shrnuje výsledky studia variability vybraných genů spojených s monogenními dědičnými chorobami skotu. Disertační práce řeší důležité a významné otázky týkající se zavedení a aplikací molekulárně genetických metod pro studium genetické variability. Za významné považují, že autor použil identifikaci polymorfismů v kandidátních genech jak pomocí již klasické metody PCR-RFLP, ale také AS-PCR a PCR-PIRA. V další části autor vyhodnocuje genetická data k určení genetické variability uvnitř jednotlivých populací skotu studovaných polymorfismů.

Disertační práce je psána českým jazykem a v celé práci jsem našel jen několik překlepů. Celá práce má 150 stran, včetně příloh. Typografická a grafická úroveň zpracování je velmi dobrá, tabulky jsou přehledné a obrázky jasně popsány. Disertační práce je členěna do obvyklých kapitol. Hlavní kapitoly prvního řádu by měly začínat na nové stránce. Po krátkém úvodu a cíli práce autor podrobně popisuje důvody a význam studia genetické variability genů, zejména ve vztahu k dědičným poruchám skotu. Následují metody, výsledky a diskuse, český a anglický souhrn, seznam literatury a přílohy.

Práce není charakterizována jedním hlavním cílem, ale dvěma dílčími cíli (uváděné v kapitolách 3.1 a 3.2). V podstatě se jedná o skrining výskytu vybraných mutací v aktuálních populacích šlechtěných zvířat různých plemen skotu v ČR, ale také jedince ze zahraničí (např. Slovensko, Polsko). Vybrané onemocnění, determinující geny a příčinné mutace včetně detekce byly podrobně popsány. V kapitole Materiál a metodika jsou charakterizovány jednotlivé populace skotu zapojené do testování. Dále jsou popsány metody molekulární genetiky pro detekci mutací, od izolace až po vlastní určení genotypů, a to poměrně podrobně. Zajímavé jsou zejména restriční analýzy v genu *ITGB2/CD18* pro detekci dalších mutací asociovaných s výskytem BLAD.

Autorovi se podařilo prokázat ve studovaných populacích skotu výskyt příčinných mutací u některých genů jako CVM, nebo F11. Naopak u genů *ITGB2*, *UMPS*, *ASS*, *GAA*, *PYGM*, nebyly zjištěny žádné mutace. Disertační práce má hlavně charakter skriningu populací na výskyt mutací způsobující genetická onemocnění s významem pro praxi ve šlechtění. Součástí disertační práce je také kapitola doporučení pro praxi

K disertační práci mám následující připomínky a dotazy.

1. Jaký byl podíl autora na laboratorních analýzách?
2. Jakou jinou metodou by bylo možné detekovat další polymorfismy ve vybraném genu CD18, popř. v dalších genech? Proč byla vybrána metoda restriční analýzy?
3. Na str. 6 definování genomu jako soubor genů není zcela správný. Mohl by autor zpřesnit tuto definici?
4. Samostatná kapitola 2.1.1.1 zcela nezapadá do kontextu kapitoly 2.1.1. Měla být samostatnou kapitolou.
5. Na základě čeho byly vybrány studované geny?

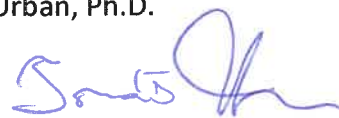
6. V Literárním přehledu bylo uvedeno více lokusů pro dědičné onemocnění, než bylo nakonec testováno. Proč byly uváděny?
7. Jaké byste navrhl uplatnění výsledků a jaká je budoucnost testování mutací genů asociovaných s onemocněními – z pohledu metodiky a ceny?
8. Budou komplexní výsledky publikovány ve významnějším vědeckém časopise?

Předložená doktorská disertační práce má minimální formální nedostatky a splňuje potřebné nároky, které jsou požadované pro tento stupeň vědecké kvalifikace. Autor si vytyčil cíle, naplánoval si testovací populace, použil vhodné metody, své výsledky publikoval na konferencích a ve člancích v oponentovaných vědeckých časopisech.

Závěrem lze shrnout, že i přes uvedené připomínky Ing. Libor Večerek prokázal schopnost samostatné tvůrčí činnosti a doporučuji přijmout práci v rámci doktorského řízení jako podklad k její obhajobě a udělit titul Ph.D. za jménem.

V Brně dne 5. 9. 2015

Doc. Ing. Tomáš Urban, Ph.D.
(oponent)



Posudek na disertační práci s názvem:

Analýza vybraných dědičných poruch zdraví skotu

Autor práce: Ing. Libor Večerek
Školitel: prof. Ing. Jindřich Čítek, CSc.
Oponent: doc. Ing. Karel Mach, CSc.

Disertační práce s výše uvedeným názvem je hodnotným vědeckým pojednáním, jak svým rozsahem, tak především úrovní řešení; splňuje všechny požadavky na tyto práce kladené. Autor prostudoval značný počet vědeckých literárních pramenů, jež se zabývají využitím minulých i současných poznatků klasické i molekulární genetiky, zaměřených na genetické choroby, zejména u skotu. V této vědecké literatuře prokázal velmi dobrou orientaci, což mu umožnilo kvalitní zpracování řešené problematiky.

Práce si vytkla celkem dva cíle, jednak se jednalo o genetickou analýzu sedmi vybraných autozomálně recesivních chorob skotu u plemen chovaných v ČR, s důrazem na odhalení zdravých jedinců, kteří jsou heterozygoti – tudíž skrytí přenašeči konkrétního onemocnění. Druhým cílem byla molekulárně genetická analýza DNA v lokusu *ITBG2 (CD18)*.

Zvířata pro genotypizaci na 7 vybraných onemocnění (*BLAD*, *CVM*, *CITRULINEMIE*, *DUMPS*, *DEFICIT KREVNÍHO FAKTORU XI*, *GSD II* a *GSD V*) byla u jednotlivých plemen vybrána s ohledem na jejich rozšíření v ČR i zahraničí a na případný očekávaný výskyt sledovaných onemocnění. V rozporu s prvním cílem práce se nejednalo vždy o plemena chovaná v ČR (analýza u 17 býku slovenského strakatého skotu). Pro genotypizaci DNA z krve, případně inseminačních dávek bylo využito standardních postupů. Počet analyzovaných jedinců na pět vybraných chorob (vyjma *GSD II* a *GSD V*) u holštýnského skotu lze považovat za dostatečný, pro objektivní analýzu frekvence nežádoucí recesivní alely a případnému výskytu heterozygotů. Totéž ve značné míře platí i pro český strakatý skot, za drobný nedostatek v tomto směru však považuji absenci analýzy na *CVM*. Genotypizaci u dalších plemen, vzhledem k počtu jednotlivých zvířat, lze v souladu s tvrzením autora, považovat pouze za orientační.

Vytčené cíle práce byly splněny. Autor získal značný počet údajů, které dokázal vhodným způsobem zpracovat a vyvodit z nich přínosné závěry. Zjištěný O výskyt onemocnění *BLAD* lze považovat za pozitivní, otázkou však je zda v současné době minimální počet prováděných vyšetření (s. 75), nepovede k opětovnému výskytu tohoto onemocnění. U choroby *CVM* bylo zjištěno 32 heterozygotních plemenic z celkového počtu 161 cíleně vybraných krav pro genotypizaci na základě jejich rodokmenu. Tento počet není zanedbatelný, v souladu s poznatky a závěry

autora je třeba pro plemenitbu využívat pouze homozygotně dominantní býky, což by mělo v dalších generacích zabránit výskytu jedinců homozygotně recesivních, tudíž nemocných. Nulový výskyt homozygotů recesivních i heterozygotů u dalších analýz (s výjimkou jediné heterozygotní dojnice holštýnského skotu u vzorku získaného z Německa, zde se jednalo o výskyt deficitu krevního faktoru XI), by nemělo vest k poklesu úsilí ve vyhledávání výskytu genetických chorob.

Připomínky a dotazy

Kromě jasně definovaných a uvedených cílů by práce měla rovněž obsahovat vědeckou hypotézu, od které se odvíjí další části práce, počínaje výše citovaným cílem práce.

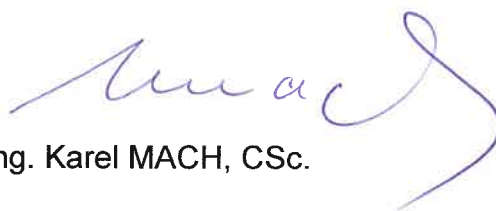
Izolace DNA a následná genotypizace, pokud se jedná o všeobecně platné standardní postupy, je v práci uvedená příliš detailně – stačilo by uvést případný zdroj. Vypíchnout však je třeba optimalizační odchylky, vyvinuté pracovištěm, na kterém byla práce řešena.

„Opatření Svazu chovatelů holštýnského skotu ČR k evidenci a eliminaci výskytu dědičných vad v populaci holštýnského skotu v ČR“ (příloha 2 na s. 149 a 150) nabyla účinnosti 1.1.2004. Neměla by být tato opatření aktualizována na základě návrhů, uvedených v kap. 6.3: Doporučení pro praxi. Pokud ano, o které návrhy by se mělo jednat?

Které ze získaných poznatků by měly být rozvíjeny další výzkumnou činností?

Závěr

Doktorská disertační práce Ing. Libora Večerka s výše uvedeným názvem odpovídá požadavkům kladeným na vědecké spisy tohoto typu. Autor prokázal schopnost samostatné vědecké práce. Práci doporučuji k obhajobě a po jejím úspěšném obhájení rovněž doporučuji, aby byl autorovi udělen akademický titul „DOKTOR“.



Doc. Ing. Karel MACH, CSc.

V Praze 8. srpna 2015

OPONENTSKÝ POSUDEK
na doktorskou disertační práci Ing. Libora Večerka
„Analýza vybraných dědičných poruch zdraví skotu”

Školitel: prof. Ing. Jindřich Čítek, CSc.

Předložená práce řeší aktuální téma využití poznatků molekulární genetiky aplikací u skotu ke studiu vybraných recesivních genů podílejících se na založení a fenotypovém projevu poruch zdraví.

Disertační práce je sepsána na 148 stránkách členěných do obvyklých 9 kapitol, práce obsahuje 42 tabulek a 14 obrázků v textu práce a 2 přílohy. V seznamu použité literatury je uvedeno cca 295 aktuálních i starších pramenů dané a související literatury převážně zahraniční provenience.

Po prostudování rozsáhlé práce je možno konstatovat, že předložená práce naplňuje cíl+ jak je uveden na str.47.

Literární přehled je zpracován velmi rozsáhle v rozsahu 41 stran - první část charakterizuje obecně aspekty genetických chorob, dále pak uvádí přehled a charakteristiky 14 nejzávažnějších vybraných dědičných poruch zdraví skotu též s ohledem na možný výskyt v ČR. Závěr přehledu literatury charakterizuje vybrané metody použitelné pro genotypizaci příslušných lokusů. Podstatná část kapitoly se věnuje přímo tématu práce a dává dobrý přehled o dosavadních výsledcích výzkumu recesivně založených chorob skotu. Tato kapitola poskytuje ucelenou informaci o studované problematice. Velmi dobře a přehledně je zpracováno pojednání o jednotlivých dědičných vadách – tato část ukazuje na velmi dobré věcné i metodologické znalosti (a snad i zálibu) autora v molekulární genetice.

Kapitola Materiál a metodika ve vyčerpávajícím rozsahu uvádí použité soubory zvířat, pracovní postupy v laboratoři včetně reagentů i postupy vyhodnocení výsledků – jsou zvoleny jako vhodné a adekvátní.

Kapitola Výsledky a diskuze charakterizuje výsledky vlastní práce v logickém sledu – u všech recesivních defektů (BLAD, DUMPS, CVM, GSD V, GSD II, Citrulinémie, Faktor XI, a analýza lokusu ITGB 2 se zabývá hlavními aspekty studia, tj. metodou genotypizace, výskytem recesivní alely ve sledovaných populacích plemeníků a plemenic zvolených plemen skotu. Velkým kladem práce je komplexní studium problematiky s návazností na bezprostřední využití získaných poznatků v chovatelské praxi. Vzhledem k faktu, že poznatky o sledovaných genech byly publikovány v impaktovaných časopisech (viz str.147, min 6 publikací), byly již podrobeny dostatečnému oponentnímu řízení.

S ohledem na získané poznatky jsou dosažené výsledky práce přínosem po stránce teoretické, metodické i praktické.

Předložená disertační práce taktéž po stránce formální splňuje požadavky kladené na tento druh prací, chyb textu způsobených překlepy je minimum.

K autorovi práce mám následující dotazy:

- jaký systém monitoringu by autor doporučoval pro populaci českého strakatého skotu?
- v jakém rozsahu a na které části studií se podílel.

Závěr:

Předložená kvalitní disertační práce prokazuje, že ing. Libor Večerek má velmi dobré znalosti v oboru molekulární genetiky, zvládá práci s vědeckou literaturou a je schopen realizovat a vyhodnotit náročné vědecké experimenty. Výsledky jeho práce rozšiřují možnosti aplikace poznatků molekulární genetiky ve sféře chovu skotu a tím též u jiných druhů, mají význam pro rozvoj oboru a jsou následně východiskem v další experimentální práci. Autor výsledky své práce publikuje v impaktovaném tisku. Kvalita doktorské disertační práce ing. Večerka též svědčí o velmi dobrých studijních a pracovních podmínkách na pracovišti a zároveň se projevuje velmi dobré vedení doktoranda školitelem prof. Ing. J. Čítkem, CSc.

Na základě všech výše uvedených skutečností souhlasím, aby disertační práce ing. Libora Večerka byla přijata k obhajobě a po jejím úspěšném obhájení byl ing. Večerkovi udělen akademický titul „Doktor“ (PhD).

V Praze 28.8.2015



doc. Ing. Ivan Majzlík, CSc.
ČZU v Praze