



Přírodovědecká
fakulta
Faculty
of Science

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

POSUDEK OPONENTA NA DIPLOMOVOU PRÁCI

Autor práce: Bc. Lenka Doudová

Název práce: Ověření vlivu primárních imunitních buněk a jejich detekovatelných markerů během časné fáze infekce virem klíšťové encefalitidy

Školitel práce: Mgr. Hana Mašková

Oponent práce: Mgr. Zuzana Beránková

Pracoviště opointa: Katedra medicínské biologie, PŘF JU

Bodový rozsah
hodnocení¹ Body

(1) FORMÁLNÍ POŽADAVKY

Celkový rozsah práce (pro bakalářské práce min. 18 stran, pro diplomové práce min. 25 stran), vyváženost rozsahů jednotlivých částí, logická struktura práce (u experimentálních prací doporučení pro teoretickou část do 1/3 celkového rozsahu)	0-3	3
Kvalita literární rešerše (počet použitých původních pramenných zdrojů, vhodnost výběru, aktuálnost zdrojů)	0-3	3
Správnost používání citačních odkazů (přítomnost necitovaných údajů, dodržování jednotného stylu citací, používání oficiálních zkratk časopisů)	0-3	3
Grafická úprava textu a obrázků	0-3	3
Úroveň souhrnu/annotace (i v angličtině)	0-3	3
Jazyková a stylistická úroveň, respektování platného názvosloví	0-3	3
Správnost a úplnost popisů u obrázků a tabulek (srozumitelnost bez zřetele k ostatnímu textu, vysvětlení značek, jednotky uváděných veličin)	0-3	2,5
Formální požadavky – body celkem		20,5

(2) VĚCNÉ POŽADAVKY

Splnění cílů práce	0-3	3
Schopnost porozumět výsledkům, jejich interpretace a jasný popis, srozumitelnost diskuze a závěrů	0-3	2

¹ Bodový rozsah hodnocení: 0-nevyhovující, 1-vyhovující, 2-průměrné, 3-excelentní. U teoretických prací hodnotíte jenom (1) Formální požadavky, u experimentálních prací i (2) Věcné požadavky a u prací v cizím jazyce i (3) Jazykovou úroveň práce v cizím jazyce.

Úroveň diskuse – interpretace výsledků, zařazení do kontextu v literatuře (absence diskuze výsledků s literaturou je nepřijatelná)	0-3	2
Logika postupu při vlastní výzkumné práci	0-3	3
Úplnost popisu použitých metodik	0-3	3
Experimentální náročnost práce, samostatnost při práci	0-3	3
Úroveň zpracování experimentálních dat	0-3	3
Aktuálnost použitých metod	0-3	3
Přínos práce pro obor a publikovatelnost výsledků (po případném doplnění)	0-3	3
Věcné požadavky u experimentálních prací – body celkem		25

(3) PRÁCE V CIZÍM JAZYCE

Jazyková a stylistická úroveň	0-3
-------------------------------	-----

CELKEM BODŮ (MAX/ZÍSKANÝCH)	max. 48	45,5
-----------------------------	---------	------

Komentář oponenta:

Předkládaná diplomová práce má velmi dobře zpracovaný literární úvod, který je napsaný čtivě s minimem gramatických chyb a překlepů. Experimentální část práce obsahuje velké množství primárních dat z *in-vitro* i *in-vivo* pokusů, které jsou až na drobné nedostatky srozumitelně prezentovány. Pro snazší orientaci ve výsledcích bych navrhovala začít nejprve výsledky ukazující, zda se TBEV ve zvolených modelových buňkách replikuje a zda infekce TBEV ovlivňuje přežívání buněk, a až na to navázat výsledky ukazující expresi genových markerů z rodiny IFIT a OAS.

Připomínky a dotazy, na které má student/-ka reagovat při obhajobě. Chyby, na které si má dávat student v budoucnu pozor:

Připomínky, na které si dávat pozor, ale není třeba na ně při obhajobě reagovat:

- 1) V práci je zmiňováno kompletní RPMI médium, ale postrádám informaci o jeho složení.
- 2) Stáří myší použitých v experimentu – v kapitole Materiál (str.19) je uvedeno, že byly použity myši 6-10 týdnů staré, ve výsledcích v kapitole 4.1 (str.31) je napsáno stáří 6-12 týdnů.
- 3) Str. 22: Studentka uvádí, že použitý test na měření viability buněk (alamarBlue) je založen na kolorimetrické reakci, kdy dochází k přeměně modrého resazurinu na růžový resorufin. Samotné měření vzorků bylo ovšem prováděno měřením fluorescence (ex. 550 nm, emise 590 nm). Princip testu v takovém případě tedy není založen na kolorimetrické reakci.
- 4) V případě, že jsou výsledky v grafech vztaheny k NK, tak by bylo pro snazší orientaci vhodné, kdyby byla hodnota NK uvedena vždy v popisku grafu, neboť ne vždy je tato informace z grafu na první pohled patrná.
- 5) Při srovnávání množství detekovaného viru mezi skupinami PK a LC Hypr bych doporučovala jasněji rozlišovat to, jaké rozdíly mezi skupinami byly statisticky významné a jaké nikoliv (např. ve shrnující Tabulce VI), neboť vzhledem k obecně nízkým hodnotám a velkým odchylkám mohou být některá tvrzení o zvýšení/snížení množství viru zavádějící.

- 6) Obr. 16 a 17: Znázornění statistických rozdílů mezi skupinou neinfikovaných a infikovaných buněk je dle mého názoru při detekci virové RNA a virovém titru z logického pohledu zbytečné. Ve skupině neinfikovaných myší musí být vždy hodnota nulová a žádný virus detekován být nemůže. Pokud je hodnota nenulová, znamená to, že virus v příslušném vzorku detekován byl. Zda byl ve vzorcích virus detekován či ne, je dostatečně patrné z grafů a uvádění hvězdiček vyznačující signifikanci NK versus PK/LC Hypr znesnadňují orientaci v grafu.

Připomínky a dotazy, na které má studentka reagovat:

- 1) V úvodu práce studentka zmiňuje, že některé flaviviry mohou langerin využívat jako receptor při své vazbě na buňku. Mohla by skutečnost, že byly LC buňky sortovány s použitím protilátek proti langerinu a MHCII, které pak na buňkách zůstaly navázané, nějak ovlivnit interakci viru s buňkami? Jaké procento buněk bylo při sortování langerin-pozitivních?
- 2) Str.23: Proč byly z jednotlivých orgánů připraveny suspenze o různé koncentraci? (40% suspenze mozku, 20% suspenze sleziny, 10% suspenze uzlin) a proč byl supernatant z mozku naředěn médiem 1:1?
- 3) Str.26, Tabulka IV a V: studentka uvádí, že v druhém kroku one-step qRT-PCR (teplota 95°C po dobu 5 min) dochází k „inaktivaci enzymů“. Je toto označení vhodné? Jaké enzymy jsou v tomto kroku inaktivovány?
- 4) Na základě čeho byl při detekci genových markerů v infikovaných buňkách vybrán jako referenční gen HPRT1 a proč nebyl referenční gen použit i v případě detekce virové RNA? Jaká úskalí sebou nezahrnutí referenčního genu může nést?
- 5) Obr.17: Jakou hodnotu v grafech má skupina NK a s jakou hodnotou bylo pracováno při výpočtech statistiky?
- 6) V kapitole výsledků a diskuze jsem narazila na několik nesrovnalostí, kdy popis výsledků v textu neodpovídal tomu, co bylo možné vyčíst z grafů. Prosím studentku, jestli by se k těmto nesrovnalostem mohla stručně vyjádřit:
 - a) Str.40: „*Séra z myší LC Hypr obsahovala prokazatelně nejvyšší relativní množství virové RNA v časovém intervalu 2 dpi, kdy hodnoty byly v průměru 4,35 log₂(fold change); k dalším signifikantním nárůstům docházelo v intervalech 1, 5 a 6 dpi.*“ Informace, že k signifikantnímu nárůstu v séru u LC Hypr došlo v intervalu 6 dpi, neodpovídá tomu, co zobrazuje graf na obrázku 16A (tam je naopak hodnota LC Hypr nulová)
 - b) Str.41: „*Při zkoumání relativního množství virové RNA v lymfatických uzlinách (Obr. 16B) bylo zjištěno, že u PK docházelo k signifikantnímu zvýšení titru viru v intervalech 1, 5, 6 a 7 dpi. Nejvyšších hodnot log₂ dosahovaly uzliny PK v intervalech 1 a 7 dpi, kdy průměrné hodnoty v intervalu 1 dpi byly 10,3 log₂(fold change) a 7 dpi 6,66 log₂(fold change)*“. Z grafu 16B není patrné, že by u PK v intervalu 1 dpi došlo k signifikantnímu zvýšení (dle přiloženého grafu virová RNA dosahuje hodnoty cca 1,75 log₂(fold change) nikoliv 10,3 log₂(fold change), jak studentka uvádí. Zároveň zde studentka zaměňuje pojem virová RNA a titr viru.
 - c) Str.48: „*...při porovnávání titru viru mezi PK a myšmi LC Hypr ve slezinách bylo zjištěno, že myši LC Hypr dosahují průměrně vyšších titrů viru již v intervalech 2, 4, ale i 6 dpi.*“ Informace, že u LC Hypr dochází ke zvýšení titru v čase 6 dpi vůči PK, není z grafu patrná. Naopak se zdá, že vyšší titr má skupina PK.
 - d) Str.49: Tabulka VI – studentka zde uvádí, že titr v séru byl ve skupině LC Hypr vyšší vůči PK v čase 1 a 5 dpi. Dle grafu ovšem v čase 5 dpi nebyl ve skupině LC Hypr detekován žádný virus.
- 7) V diskuzi (str.46) studentka shrnuje, že se množství virové RNA v TBEV infikovaných LC

v čase snižuje (obr.10A), ale titr viru naopak signifikantně roste (obr.11A). Zamýšlela se studentka nad nějakým vysvětlením, proč by tomu tak mohlo být?

- 8) Diskuze (str.49) – poslední věta: „...v této diplomové práci bylo jasně prokázáno, že LC hrají významnou roli při transportu TBEV v organismu, jelikož v porovnání s PK byl virus detekován obecně o den dříve a zároveň ve vyšších titrech u všech zkoumaných orgánů či sér.“ Lze na základě dat poskytnutých v předkládané diplomové práci vskutku tvrdit, že byl virus obecně detekován o den dříve? V kolika případech (z celkového počtu analyzovaných situací) byl virus ve skupině LC Hypr detekován o den dříve ve srovnání s PK skupinou? A opravdu byl virus přítomen ve skupině LC Hypr ve vyšších titrech u všech zkoumaných orgánů a sér?

Závěr:

I přes výše uvedené připomínky se jedná o velmi kvalitní práci, která jednoznačně splňuje veškeré požadavky na magisterskou diplomovou práci.

Práci

d o p o r u č u j i / ~~n e d o p o r u č u j i~~*

k obhajobě a navrhuji známku výborně .²

V Českých Budějovicích dne 15.5.2023

.....

podpis

² Je možné navrhnout známku s tím, že navržená známka může být upravená při obhajobě (pokud se oponent nezúčastní obhajoby, v posudku navržená známka se do výsledné známky nezapočítává). Znamky: výborně (1), velmi dobře (2), dobře (3), nevyhověl (4).