

Oponentský posudek na magisterskou práci Bc. Petra Pospíchala

Interakce streptomycet izolovaných z lidských tkání s buňkami savčího imunitního systému

Práce se zabývá vlivem extraktů z pěti různých izolátů bakterií rodu *Streptomyces* na přežívání, aktivaci, fagocytózu a produkci prozánětlivých cytokinů TNF a IL-1b lidskou monocytární linií THP-1. Práce je tradičně rozdělena na úvod, cíle práce, metody, výsledky, diskuzi a závěr. Má 52 stran a formálně splňuje všechny požadavky kladené na diplomovou práci.

Práce je psána čtivým, vědeckým slohem a téma pokrývá velmi srozumitelně, alespoň co se úvodu a diskuze týká. Nejslabší částí práce jsou bohužel výsledky, ve kterých autor podle mě nezvládl prezentaci dosažených, a velmi zajímavých, výsledků. K tomu se ale dostanu později. V práci jsou nějaké překlepy, ale ne nijak mnoho, čtení to neruší.

Úvod jasně shrnuje téma a důvod zaměření této práce. V úvodu mě nicméně překvapilo rozdělení na úvod a přehled literatury. Dříve jsem byl zvyklý, že úvod a přehled literatury byly jedno a totéž, ale již víckrát jsem se setkal s tím, že na počátku je úvod, pak cíle práce a pak rešerše. Osobně mi to přijde zbytečné a kontraproduktivní, protože takto práce ztrácí formát vědeckého článku, jehož psaní si má student na diplomce vyzkoušet. Toto však nepovažuji za chybu.

Otázka: Autor píše, že nedávno vznikla sbírka izolátů streptomycet. Zajímalo by mě, kde tato sbírka vznikla.

Cíle práce jsou stanoveny jasně a realisticky.

Přehled literatury je kvalitně zpracován a seznamuje nás nejprve s problematikou interakce streptomycet a mnohobuněčných organismů včetně člověka. Ve druhé části autor velmi stručně popisuje části imunitního systému, které mají souvislost s bakteriální infekcí. Některé pasáže by si zasluhovaly více rozvést, především imunologická část by měla zmínit, jak se zmiňované imunitní reakce týkají konkrétně streptomycet. Tato část je příliš obecná, obsahuje spíš učebnicové informace a je opravdu založena hlavně na jedné imunologické učebnici. Navíc citaci Gordon et Martinez, 2010 jsem nenašel mezi referencemi.

Otázka: V kapitole 3.2.3. autor píše, že makrofágy vznikají buď z kostní dřeně nebo z kostní dřeně. Toto tvrzení ale není kompletní. Jak ještě jinak vznikají makrofágy?

Materiál a metody:

Metody jsou popsány celkem precizně, mám nicméně několik více či méně závažných připomínek a otázek. Ocenil bych nějaký schématický popis přípravy jednotlivých extraktů a supernatantů, které byly použity, později ve výsledcích se přestávám orientovat, co je co, co jak bylo připraveno a podobně. **Prosím o srozumitelné popsání tohoto při obhajobě.** Pár drobných dotazů:

Jak konkrétně probíhá zbavení se rychlerostoucích bakteriálních kontaminací?

V kapitole 4.2.2.1 je uvedeno, že streptomycety byly inkubovány při 28°C, poté byla suspenze centrifugována při 4°C a 6380g a buňky byly opět zaočkovány a kultivovány při 28°C. Tento postup mi nepřijde správný. **1.) Jaký je důvod centrifugace při 4°C, když vše okolo je při 28°C? 2.) není 6380g příliš vysoká rychlost na stáčení živých buněk? Nemohou být tímto krokem streptomycety poškozené?**

Jak je zajištěno, že v extraktech nejsou zbytky extrakčních činidel (etanol, metanol, aceton, chloroform)?

Kapitola 4.2.2.3. zmiňuje tabulku I v kapitole 4.2. která by měla obsahovat objemy přidanych extraktů. Tyto hodnoty však v tabulce 1 nejsou. **Kde tedy jsou?**

V kapitole 4.2.3. je použit výraz „buňky byly sfoukány“. Toto rozhodně není vhodně použitý výraz.

Výsledky:

Výsledky jsou bohužel nejslabší částí práce. Autorovi se podle mě nepovedlo prezentovat velmi zajímavá data jasně a přehledně. První chybou je nekonzistentnost v popisu grafů a tabulek. Autor např. napíše, že byl pozorován pokles o 20% a v grafu ukáže 80% sloupek, tj. ne pokles „o“, ale pokles „na“. Popis by měl vyjadřovat to, co je na obrázku, aby čtenář nemusel dopočítávat procenta.

Obrázky 3-6 jsou ještě srozumitelné (až na výše uvedené dopočítávání procent). Jakmile však autor používá více kombinací, začíná být graf nepřehledný, kontroly nejsou dostatečně vysvětlené, není popsáno, vůči čemu se vztahují hvězdičky u statistiky, není zmíněn počet vzorků ve skupině (n), co hvězdičky znamenají, co znamenají chybové úsečky (SD nebo SEM), jak byl pokus vyhodnocen. Všechny tyto informace mají být uvedené přímo u obrázku, obrázky by měly být samovysvětlující. Navíc popis jednotlivých sloupečků – užití čísla vzorku pro mě bylo velmi matoucí.

Obrázky znázorňující antimikrobiální aktivitu by zasloužili podrobnější vysvětlení, co vlastně vidíme. **Prosím autora o podrobnější vysvětlení, jak tato metoda funguje a co obrázky znázorňují.**

Kolikrát byly jednotlivé pokusy opakovány?

Diskuze:

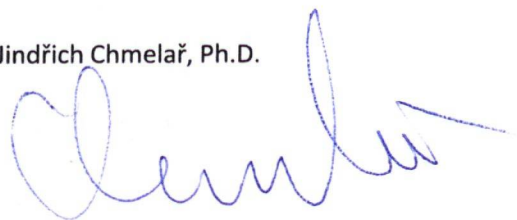
Diskuze je velmi povedená a obsáhlá. Autor diskutuje získané výsledky s dostupnou literaturou a diskuze obsahuje mnoho podnětů k dalšímu zamyšlení. Líbí se mi, že diskuze neobsahuje příliš odvážné spekulace, ale literaturou podložené interpretace výsledků. Nicméně některé pasáže, např. na str. 43 patří spíše do výsledků, protože jsou spíše popisné. Ke konci kapitoly 6.2. mi chybí reference k několika tvrzením, týkajících se genové exprese a genetiky obecně. Jinak je ale diskuze vypracována pečlivě.

Otázka: Autor píše na str. 39, že pokles produkce ROS byl částečně způsoben sníženou životností. Osobně mi přijde, že to byl jediný důvod snížení ROS. **Proč autor usuzuje pouze na částečný účinek? Prosím o bližší diskuzi k rozdílům mezi 30 a 90 minutami inkubace. Je možné, že pokles ROS předchází smrti buněk a proto jde spíše o časovou souslednost než o nezávislé účinky?**

Celkově je práce zdařilá, přestože má svá slabá místa. Autor prokázal schopnost interpretovat výsledky na základě porovnání s dostupnou literaturou. Experimentálně je práce dostatečná, autor provedl řadu experimentů a měření, nicméně prezentace výsledků není zrovna moc přehledná. Nicméně vzhledem k ostatním částem práce, které se mi velmi líbily, **doporučuji práci k obhajobě a navrhuji známku 1-2.** Pokud budou zodpovězeny otázky a prezentace bude srozumitelnější, s vypíchnutými podstatnými výsledky, rád se přikloním k lepšímu hodnocení.

V Českých Budějovicích 8.1.2018

RNDr. Jindřich Chmelař, Ph.D.



JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH, PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA,
Katedra medicínské biologie

Oponentský posudek na magisterskou práci

Název práce: Interakce streptomycet izolovaných z lidských tkání s buňkami savčího imunitního systému

Autor: Bc. Petr Pospíchal

Oponent: Ing. Václav Křišťufek, CSc., BC AV ČR, v. v. i. - ÚPB

HODNOCENÍ PRÁCE – OBSAHOVÁ STRÁNKA

Název dobře vystihuje obsah práce, je věcný a stručný. Cíle práce jsou jasně formulované, hypotézy nejsou uvedené. Práce má 52 stran, 4 tabulky, 14 obrázků a 36 citací v části Literatura.

Úvod je vystižný, literární přehled se vztahuje k zadané problematice a obsahuje dostatečné množství informací, které shrnuje na přiměřené úrovni poznání v dané oblasti; kriticky hodnotí použité informace. Použité informační zdroje jsou založené zejména na původní zahraniční a domácí literatuře, ale dohledatelnost velké části z nich je v kapitole Literatura nemožná. Kapitola Materiál a metody je přehledná a srozumitelná, nechybí nic podstatného, množství materiálu (pozorování, opakování) a použité metody jsou takové, že pomohly splnit vytčené cíle.

Výsledky jsou vhodně prezentované s jedním postřehnutým nedostatkem (viz níže), odpovídají použité metodice, k vyhodnocení byla použita vhodná statistická metoda.

Interpretace dat je odpovídající, autor prokázal znalost studované problematiky, která se projevuje zejména v části diskuze. Závěry práce jsou jednoznačné a odpovídají na cíle práce.

Obsažené informace jsou pro obor nové a mohou tvořit základ velmi kvalitní publikace v odborném vědeckém časopise. Doporučuji brzké publikování získaných dat.

HODNOCENÍ PRÁCE - FORMÁLNÍ STRÁNKA

Obrázky a tabulky jsou přehledné a obsahují potřebné informace. Text je bez větších formálních nedostatků. Jazyk odpovídá gramatické správnosti, možnostem a zvyklostem používání v odborném textu. Literatura je citována s chybami, občas nejednotně, citace v textu neodpovídají seznamu literatury (chybějící nebo přebývající citace).

Doplňující komentář:

- V práci jsem nenalezl zmínku na které katedře PřF JU v Č. Budějovicích byla magisterská práce vypracována. Bývá dobrým zvykem tuto skutečnost uvádět i s ohledem na studentem využívané zázemí a práce mnoha lidí katedry. Již v části Poděkování jsem se potkal s prvními náznaky určité nedbalosti studenta, která pak vrcholí v části Literatura. Děkuje zde Dr. H. Hanghansové, Ph.D. zatímco má být, jak jsem si dohledal, Dr. H. Langhansové, Ph.D.

3. Přehled literatury:

3.1. Bakterie rodu *Streptomyces* (str. 4) - chybí několik citací uvedeného přehledu.

3.1.4. Lidské patogenní druhy streptomycet (str. 8) - jsou zde uvedeny názvem dvě sbírky streptomycet, je vhodné uvést aspoň www stránky zmíněných institucí.

4. Materiál a metody:

4.1.2. (str. 12) - není uveden správně název sbírky ze které pocházely testované kmeny streptomycet, má být Sběrka kultur půdních aktinomycet České Budějovice (CCSACB, www.actinomycetes.cz), ta je součástí Sběrky kultur Biologického centra AV ČR, v. v. i. (BCCO).

- 4.2.5. Zpracování výsledků, (str. 22) - chybné je uvedení použité statistické metody. Nemůže být ...jednocestné anovy....., je metoda jednocestná ANOVA (z ANalysis Of VAriance).

5. Výsledky:

- 5.2. Vliv extraktů metabolitů...., (str. 30) - je uvedeno ...U aktivovaných buněk došlo pouze u vzorku GYM+RPMI(M) 14 k signifikantnímu snížení.....; má býtGYM+RPMI(M) 13.....

- 5.2. Vliv extraktů metabolitů...., (str. 31) - je uvedena první věta - Polární i nepolární extrakty ze streptomycetového kmene TR38 měly podobný vliv na produkci TNF buňkami THP-1 - ale toto tvrzení není pravdivé s ohledem na pokračující text na str. 31. Je přeci rozdíl mezi "plicními" kmeny (TR1, TR24) a "neplicním" kmenem (TR38) - vysvětlete.

6. Diskuze:

- Kvalitní část práce, ale podobně jako v části 3. Přehled literatury chybí citace, např. str. 40Odpadní produkty bakteriálního metabolismu mohou chování a životnost THP-1 též ovlivňovat (chybí CITACE). Strana 44, dole, Doposud publikované články (chybí CITACE) se zaměřují...., str.45, uprostřed, Nález tohoto kmene ve více různých tkáních.....lidské tělo (chybí CITACE).

7. Závěr:

- Poslední odstavec - Na základě získaných dat lze konstatovat, že....., ale přeci existují literární odkazy...tedy lépe: Na základě získaných dat a *literárních údajů* lze konstatovat.....

9. Literatura:

- Nejslabší část práce, celkem 5 odkazů je uvedeno v části Literatura, ale není uvedeno v kapitolách textu (uvádím zkráceně): Aminov a Mackie (2007), Carey et al. (2001), Duraijar et al. (2015), Ser et al. (2016), Syh-Jae (2004).

- Celkem 14 (!) citací je uvedeno v textu kapitol, ale není zmíněno v části Literatura (uvádím zkráceně): Quinton 2008, Manteca 2008, Chater 2010, Gerber 1965, Yin 2007, Develoux 2003, Kapadia 2007, Manceta 2007, Moos 2003, Ekkelenkamp 2004, Tucher 2010, Gordon 2010, Hooi-leng 2016, Cecrdlova 2016.

- U následující citace je rozpor v roce publikování uvedený v textu resp. v části Literatura (uvádím zkráceně): Yang et al. (2008 nebo 2016?).

- A dále je: Callado nebo Collado et al. 2016, Taechovisan et al. 2016 nebo Taechowisan at al. 2016?

- Strana 17: Syh-Jae 2004 má být Syh-Jae et al. 2004.

- Citace Žlábková, Z. (2017), Rozpracovaná bakalářská práce,odpovídá to standardům uvádění citací na PřF JU?

Orientace čtenáře v části Přehled literatury a Diskuze je tak, na základě výše uvedeného, snižená a neumožňuje si plně dohledat odkazy na literaturu.

Otázky pro předkladatele práce:

Jaké jsou důvody stále nízké objasněnosti vlivu lidských kmenů streptomycetů pro hostitelský organizmus? Popište vaši představu postupu (na základě dostupných informací a znalostí) úspěšné izolace kmene streptomycety z dekontaminovaného sputa a z dělohy po císařském řezu a následnou identifikaci izolovaného kmene. Uveďte praktický význam vašich výsledků.

Práci, s ohledem na dosažení významných experimentálních výsledků, doporučuji k obhajobě a hodnotím klasifikačním stupněm DOBŘE.

Datum: 10. ledna 2018

Podpis oponenta.....

