

Oponentský posudek na magisterskou diplomovou práci Bc. Viktorie Tothové s názvem „Hyaluronidáza ve slinách ovádů a klíšťat“

Předkládaná magisterská práce měla dva cíle obsažené v podstatě již v názvu práce – ověřit přítomnost hyaluronidázové aktivity ve slinách klíštěte *Ixodes ricinus* a porovnat a charakterizovat tuto aktivitu ve slinách různých druhů ovádů.

Hyaluronidázy (zkráceně hyázy) jsou glykanázy vyskytující se u různých eukaryotických i prokaryotických organismů, kde hrají roli v nejrůznějších biologických dějích, jako jsou např. morfogeneze a přestavba tkání, invaze karcinomů do pojivových tkání, invaze patogenů (včetně mnohobuněčných parazitů) do hostitelských tkání, a v neposlední řadě fungují jako tzv. spreading faktor pro další bioaktivní molekuly obsažené v živočišných jedech a slinách krevsajících členovců díky tomu, že štěpí amorfní složku pojivových tkání založenou na hyaluronanu, popř. chondroitinsulfátu. Důležitým faktem z hlediska člověka je i to, že jsou jednou z alergenních komponent obsažených v jedech a slinách některých členovců.

Protože se jedná o značně zajímavou a heterogenní skupinu enzymů z hlediska biologického i biochemického, jejich studium u dalších druhů živočichů je jistě nasnadě, obzvláště v případě krevsajících členovců, kde tyto enzymy vektorů mohou usnadňovat přenos patogenů na další hostitele.

Práce zahrnuje cca 50 stran vlastního textu a je členěna obvyklým způsobem. Literární úvod je výstižný a zahrnuje nejdůležitější poznatky obecně o hyaluronidázách a jejich substrátech, metodách detekce hyaluronidázové aktivity, ve speciální části se pak podrobněji věnuje výskytu těchto enzymů u krevsajících členovců, včetně kontextu s dalšími bioaktivními molekulami v jejich slinách. Seznam citované literatury zahrnuje slušných 129 relevantních citací, převážně recentních vzhledem k tématu. Formální a logická stránka literárního úvodu má však některé nedostatky. Objevuje se řada formulačních nepřesností a neobratností, jež někdy vedou ke zkreslení obsahu, např. str. 8 „(hyaluronidázy) ovlivňují zánětlivou reakci ve tkáni a regulují její koagulaci“, str. 19 „hematofágie se nezávisle vyvinula u 14 000 druhů hematofágních členovců konvergentní evolucí“, str. 21 „serinové proteázy, které katalyzují thrombin“ atd. Dále se místy objevují rozporné informace, např. na straně 21 autorka tvrdí, že „*Tabanus* běžně napadá člověka“, zatímco na straně 22 již tvrdí, že „*Tabanus* zpravidla neútočí na lidi“, flebotomové jsou jednou uváděni jako čeled' Psychodidae, jednou jako Phlebotomidae atp. Popisy jednotlivých metod v části úvodu tomu věnované jsou převážně zmatené a nevystihují základní principy tak, aby byly pochopitelné i pro čtenáře, který konkrétní metodu nezná. V celé práci autorka místy opomíná psát latinské názvy organismů kurzívou. Toto je jen několik příkladů pro zachování

stručnosti posudku. Obrovským problémem je práce s citacemi. Některé citace úplně chybí v seznamu literatury, jiné jsou špatně citované (v případě dvou autorů je někdy uveden kolektiv (např. na str. 19 - Beaty et al. 1996), v případě více autorů jsou naopak někdy uvedeni v textu jen dva první. Od strany 7 do strany 20 jsem napočítal nejméně 21 chyb v citacích (nezanedbatelná část chybí v seznamu), v to nepočítám překlepy ve jménech autorů a fakt, že citace jsou řazeny v „anglické abecedě“ (autorka neuznává písmena „Ch“ a „Č“ v případě českých autorů) a jména jsou v českém textu spojena spojkou „and“. Od str. 21 jsem formální stránku citací nesledoval a věnoval se raději jen faktické stránce. Za další chybu považuji anglické texty v obrázcích a nevysvětlování zkratk použitých v obrázcích, místy i v textu. V celém textu se občas (ne příliš) vyskytují běžné překlepy a chybějící písmena ve slovech, někdy bohužel i v názvech organismů („*quinquefaciatus*“, „*Onithodoros*“).

Kapitola „Metodika“ má závažné nedostatky a zjevné chyby v popisu použitých metod, pro stručnost uvedu jen některé. Str. 27 – chybí zásadní údaj pH použitého Tris-HCl pufru, není jasné, na jakém principu funguje použitá metoda měření proteinů - zmatený popis, co je zkratka QT..., str. 28 – nejsou vysvětlené zkratky chemikálií jako EDAC, NHS, není uveden typ destičky pro kovalentní vazbu biotinylovaného hyaluronanu (v tomto kontextu zásadní informace), str. 29 – není uvedeno, co sloužilo jako standard k vyjádření jednotek aktivity, není uvedeno složení substrátového roztoku, není uvedeno, že byla měřena absorbance – místo toho „měřena reakce na fluorometru“. Opakovaně nejsou uváděna pH pufrů, nejsou vysvětlovány zkratky. Str. 31 – kap. 4.4 evidentně špatně popisuje složení gelu s odkazem na kap. 4.3, složka B elektroforetického gelu uvedena jako směs 75 ml acetátového pufru pH 5,5 a 4 ml Tris-HCl pH 8,8 (tak by gel v Laemmliho systému určitě nedělil). Kap. 4.6 – není jasné, jaké složení mají vzorkové pufrы pro nanášení vzorků na „dot gel“, jaká byla finální koncentrace SDS. Většina z těchto nedostatků neumožňuje reprodukovatelnost metod. Tato kapitola je psána poměrně primitivním slohem, který svědčí o tom, že autorce samotné nejsou zřejmě některé principy úplně jasné – na jednu stranu chybí důležité informace, na druhou stranu se objevují nepodstatné údaje.

Výsledky týkající se hyázové aktivity u klíštěte zahrnují jediný jednoduchý experiment s negativním výsledkem, obsah kapitoly tak tvoří hlavně výsledky získané se slinnými žlázami ovádů.

Kapitola „Výsledky“ má rovněž některé, dle mého názoru vážné, nedostatky ve zpracování. Z kapitoly 5.3 (ani z předchozí metodiky) nevyplývá, co bylo standardem pro kvantifikaci aktivity studovaných enzymů a chybí vysvětlení zkratky (potažmo pojmu) „TRU“, tedy jednotky, ve které byla aktivita vyjadřována. Na str. 37 je Graf 1 (kalibrační křivka) – nechápu smysl jeho uvedení, když pro každou destičku se dělá zvláštní kalibrace. Kromě toho

body v grafu jsou spojené, místo aby byly proložené přímkou lineární regrese. Za velice zásadní chybu považují, že výsledky experimentů týkajících se stanovení pH optim hyázových aktivit a především pak kvantifikace a porovnání aktivit enzymů u jednotlivých druhů ovádů nejsou statisticky zpracovány (v grafech nejsou ani standardní odchylky), dokonce není ani uveden počet opakování experimentu, zda se jednalo o jeden vzorek opakovaně použitý či o několik vzorků (směsných či z jednoho ováda), přitom autorka prezentuje i např. rozdíl v enzymatické aktivitě mezi dvěma roky odchytu jednoho druhu ováda. Na str. 38 v posledním odstavci je špatně interpretován Graf 6 (navíc s chybným odkazem na Graf 2) – hovoří se zde o „aktivitě enzymu“ a jejím srovnání mezi jednotlivými druhy – nelze srovnávat specifické aktivity enzymu v případě, kdy se jedná o celkový proteinový extrakt – není jisté, zda „vyšší aktivita“ vztažená na mg proteinu je důsledkem vyšší specifické aktivity enzymu anebo jeho větším podílem v celkovém extraktu (podobná nepřesnost v interpretaci se objevuje i v Diskusi a ve Shrnutí).

Diskuse je psaná stručně a nepouští se do přílišných detailů interpretace molekulárních vlastností hyaluronidáz (které by ale byly velice zajímavé), nicméně postihuje hlavní a důležité kontexty vlastních výsledků s již zjištěnými fakty. Bohužel také obsahuje některé nepřesnosti či nepodložené interpretace. Např. str. 51 – tvrzení, že aktivita studovaných enzymů vůči chondroitinsulfátu je u ovádů silnější než vůči hyaluronanu (narozdíl od např. flebotomů) není podloženo žádným alespoň trochu spolehlivě kvantifikovatelným výsledkem. Str. 54 – myšlenkový vývod autorky, že „se savčí PH-20 (pozn. - testikulární hyáza) je hyáza z jedů hymenopter homologní z 20% (pozn. - zde navíc chybně použit výraz homologní), pravděpodobně proto lidé reagují i na minimální dávku alergenu (pozn. - z jedu hymenopter)“ by znamenal, že si člověk vyvine (auto)alergickou reakci na vlastní (či cizí) sperma v souvislosti s alergizací včelím či vosím bodnutím – **je toto jen další z neobratností v textu, anebo je něco takového skutečně známo?**

Další otázky oponenta:

- Autorka na str. 17 uvádí, že „hyázy helmintů *Haemonchus* a *Ascaris* se podílejí na přestavbě těla parazita“ – Jakým způsobem? Co je jejich substrátem? Hyáza těchto červů neštěpí chondroitinsulfát, který se v evoluci objevuje dokonce dříve než hyaluronan, o kterém se předpokládá, že se poprvé objevuje u kopinatce (jak autorka sama uvádí v literárním přehledu). Podobně na str. 18 hyáza krilu „podílejí se na rychlé degradaci těla“.
- Jaké (hypotetické) vysvětlení by měla autorka pro fakt, že u některých komárů (jako solenofágů) se hyáza vyskytuje (viz *Culex*) a u některých ne (viz *Anopheles*).

- Původní interpretace výsledků na 2 druzích klíšťat ze 70. a 80. let (Neitz) je, že jejich hyáza má velikost 9,6 kDa. Není už to samo o sobě podezřelé? V jakých rozmezech velikostí se pohybují známé hyázy? Proč jste ve svých experimentech nepřistoupili k hledání hyázové aktivity u *Ornithodoros* a *Amblyomma* pomocí nových citlivých metod a namísto toho jste se zaměřili na *Ixodes ricinus*, kde byla v roce 2008 k dispozici cDNA knihovna slinných žláz, v níž ale nebyl objeven gen pro hyaluronidázu?
- Čím si autorka vysvětluje výrazně nižší pH optimum hyázy u rodu *Haematopota* vůči ostatním testovaným rodům?
- Jak by autorka vysvětlila vyšší molekulovou velikost bandů s hyázovou aktivitou v redukujících podmínkách SDS-PAGE oproti neredukujícím?

Závěrem: práce obsahuje podprůměrné množství experimentálních výsledků, v porovnání s běžným standardem Katedry parazitologie PřF UK – také vzhledem k tomu, že autorka uvádí, že s odchytom ovádů započala již v roce 2006. Zpracování a interpretace výsledků by jistě zasloužily pečlivější a promyšlenější přístup, stejně jako formální stavba textu a ošetření citací. Za pozitiva práce považuji, že autorka v literárním přehledu zpracovala poměrně slušné množství převážně primárních pramenů vztahujících se k problematice, zvládla metody odchytu tabanidů v terénu a jejich spolehlivé určování (vrchol sezóny ovádů je poměrně krátký), včetně pitev ovádů a izolaci jejich slinných žláz, dále se naučila prakticky některé standardní laboratorní metody (měření proteinů, elektroforéza a zymografie, měření enzymatické aktivity). Za důležitý výsledek, který může sloužit jako východisko k další biochemické a molekulární práci, považuji zjištění, že aktivita hyaluronidáz ve slinných žlázách ovádů je mnohem větší než u jiných telmofágních krevsajících (třeba flebotomů), což dobře zapadá do obrazu strategie příjmu krve ovády a což může mít důležité konsekvence v mechanickém přenosu některých patogenů ovády.

Po zvážení všech pozitiv i negativ předložené diplomové práce doporučuji tuto k obhajobě, bohužel nejlepším akceptovatelným hodnocením je pro mě stupeň „dobře“.

V Praze dne 7. září 2010

RNDr. Libor Mikeš, Ph.D.

Katedra parazitologie PřF UK v Praze